

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HIROTA, Masanori
Room 502, Akasakaaoi Bldg. No.11,
8-11, Akasaka 2-chome
Minato-ku, Tokyo 107-0052
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 12 mars 2002 (12.03.02)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference A031-29PCT	
International application No. PCT/JP01/04731	International filing date (day/month/year) 05 juin 2001 (05.06.01)

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor	<input checked="" type="checkbox"/> the agent
<input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address 1) HIROTA, Masanori 2) OZAWA, Seiji Room 502, Akasakaaoi Bldg. No.11 8-11, Akasaka 2-chome Minato-ku, Tokyo 107-0052 Japan	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name	<input checked="" type="checkbox"/> the address
<input type="checkbox"/> the nationality		
<input type="checkbox"/> the residence		
Name and Address 1) HIROTA, Masanori 2) OZAWA, Seiji 3F, Wakabayashi Bldg. 8-5, Akasaka 2-chome Minato-ku, Tokyo 107-0052 Japan	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input checked="" type="checkbox"/> the designated Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input type="checkbox"/> the elected Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Yukari NAKAMURA Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	---

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
(PCT18条、PCT規則43、44)

出願人又は代理人 の書類記号 A031-29PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP01/04731	国際出願日 (日.月.年) 05.06.01	優先日 (日.月.年) 19.07.00
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 6 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 1 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☒ 請求の範囲 27, 29 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
別紙 (特別ページ) 参照。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/12, 5/10, C07K 14/705, 16/28, C12Q 1/68, C12P 21/02, A61K 38/00, 45/00, A61P 31/04, 35/00, 37/08, G01N 33/15, 33/50, 33/566, 33/577//C12P 21/08, (C12N 15/12, C12R 1:91) (C12N 5/10, C12R 1:91)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/00-15/90, C07K 14/00-14/825

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	HEMMI H. et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature Dec. 2000, Vol. 408, p. 740-745	1-26, 28, 30
P, X	DU X. et al. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression and evolution. Eur. Cytoline Netw. Sept. 2000, Vol. 11, No. 3, p. 362-371	1-26, 28, 30

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.08.01

国際調査報告の発送日

21.08.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, A	HACKER H. et al. Immune Cell Activation by Bacterial CpG-DNA through Myeloid Differentiation Marker 88 and Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor (TRAF) 6. J. Exp. Med. Aug. 2000, Vol. 192, No. 4, p. 595-600	1-26, 28, 30
A	WO 98/50547 A2 (SCHERING CORP.) 12.11月.1998(12.11.98) & AU 9871754 A & EP 980429 A2	1-26, 28, 30
A	KOPP E. B. et al. The Toll-receptor family and control of innate immunity. Curr. Opin. Immunol. 1999, Vol. 11, No. 1, p. 13-18	1-26, 28, 30
A	TAKEUCHI O. et al. TLR6: A novel member of an expanding Toll-like receptor family. Gene 1999, Vol. 231, p. 59-65	1-26, 28, 30
A	CHAUDHARY P. M. et al. Cloning and characterization of Two Toll/Interleukin-1 Receptor-Like Genes TIL3 and TIL4: Evidence for a Multi-Gene Receptor Family in Humans. Blood 1998, Vol. 91, No. 11, p. 4020-4027	1-26, 28, 30
A	ROCK F. L. et al. A family of human receptors structurally related to <i>Drosophila</i> Toll. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, Vol. 95, p. 588-593	1-26, 28, 30
A	FEARON D. T. et al. Seeking wisdom in innate immunity. Nature 1998, Vol. 388, p. 323-324, 394-397	1-26, 28, 30
A	WO 99/51259 A2 (UNIV. IOWA RES. FOUND.) 14.10月.1999(14.10.99) & AU 9934678 A & EP 1067956 A2 & US 6218371 B1	1-26, 28, 30
A	Krieg A. M. The role of CpG motifs in innate immunity. Curr. Opin. Immunol. Feb. 2000, Vol. 12, No. 1, p. 35-43	1-26, 28, 30

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	TAKEUCHI O. et al. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. Int. Immunol. Jan. 2000, Vol. 12, No. 1, p. 113-117	1-26, 28, 30

第 I 欄 2. について

請求の範囲 27 に記載のアゴニスト又はアンタゴニスト、請求の範囲 29 に記載の医薬組成物は、請求の範囲 23 ～ 26 に記載のスクリーニング方法によって特定されており、当該スクリーニング方法によって得られるあらゆるアゴニスト又はアンタゴニスト及び医薬組成物を包含するものである。

しかしながら、明細書には、当該スクリーニング方法で得られるアゴニスト又はアンタゴニスト及び医薬組成物としての具体的なものが一切記載されていないから、請求の範囲 27, 29 は明細書による裏付けを欠いており、開示も欠いている。また、出願時の技術常識を勘案しても具体的にどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのかが全く不明であって、前記請求の範囲の記載は著しく不明確である。

したがって、前記請求の範囲に記載された発明について有意義な調査をすることができない。

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

HIROTA, Masanori
Room 502, Akasaka Bldg. No.11,
8-11, Akasaka 2-chome
Minato-ku, Tokyo 107-0052
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 24 January 2002 (24.01.02)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference A031-29PCT			
International application No. PCT/JP01/04731	International filing date (day/month/year) 05 June 2001 (05.06.01)	Priority date (day/month/year) 19 July 2000 (19.07.00)	
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has **communicated**, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:

US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

CA,EP

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 24 January 2002 (24.01.02) under No. WO 02/06482

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and the PCT Applicant's Guide, Volume II.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.91.11

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU


To:

HIROTA, Masanori
Room 502, Akasakaaoi Bldg. No.11,
8-11, Akasaka 2-chome
Minato-ku, Tokyo 107-0052
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 04 September 2001 (04.09.01)	
Applicant's or agent's file reference A031-29PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP01/04731	International filing date (day/month/year) 05 June 2001 (05.06.01)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 19 July 2000 (19.07.00)
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
19 July 2000 (19.07.00)	2000-219652	JP	20 July 2001 (20.07.01)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer S. Mandallaz  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 1 月 24 日 (24.01.2002)

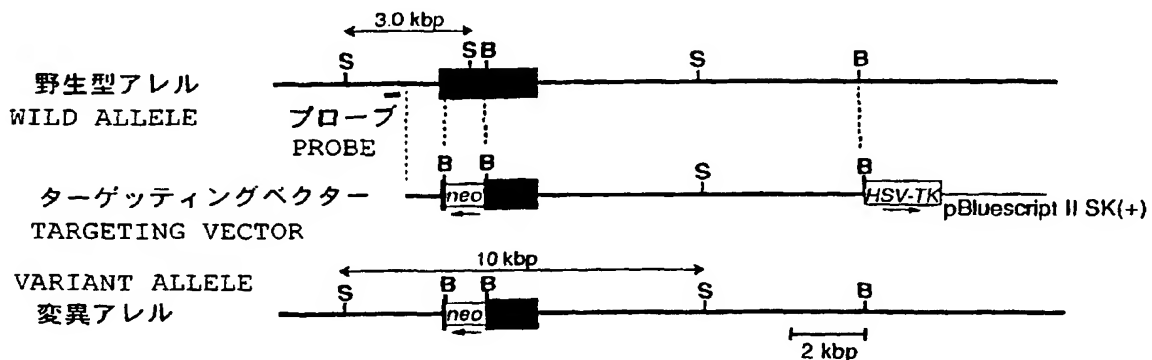
PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/06482 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/12, 5/10, C07K 14/705, 16/28, C12Q 1/68, C12P 21/02, A61K 38/00, 45/00, A61P 31/04, 35/00, 37/08, G01N 33/15, 33/50, 33/566, 33/577 // C12P 21/08, (C12N 15/12, C12R 1:91) (C12N 5/10, C12R 1:91)
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 審良静男 (AKIRA, Shizuo) [JP/JP]; 〒569-0036 大阪府高槻市辻子一丁目7番16号 Osaka (JP). 辺見弘明 (HEMMEI, Hiroaki) [JP/JP]; 〒567-0048 大阪府茨木市北春日丘四丁目11番47号 112号室 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/04731
- (22) 国際出願日: 2001 年 6 月 5 日 (05.06.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2000-219652 2000 年 7 月 19 日 (19.07.2000) JP
- (74) 代理人: 廣田雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒107-0052 東京都港区赤坂二丁目8番11号 第11赤坂葵ビル502 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): CA, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: RECEPTOR PROTEIN SPECIFICALLY RECOGNIZING BACTERIAL DNA

(54) 発明の名称: 細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質



(57) Abstract: A receptor protein specifically recognizing a bacterial DNA having an unmethylated CpG sequence; a gene DNA encoding the same; and model animals useful in studying immune responses of immunocytes to bacterial infectious diseases. A DNA encoding a receptor protein specifically recognizing a bacterial DNA having an unmethylated CpG sequence is screened by the BLAST search method. Next, a number of EST clones highly analogous to various TLRs are screened. By using these clones as probes, a full-length cDNA is isolated from a mouse macrophage cDNA library. After analysing the base sequence of the cDNA and confirming that it is TLR9 having conserved domains such as LRR and TIR domains, a knockout mouse is constructed. Thus it is confirmed that TLR9 is a receptor protein of an oligonucleotide containing the unmethylated CpG sequence of a bacterial DNA.

[続葉有]

WO 02/06482 A1



(57) 要約:

非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質や、それをコードする遺伝子DNAや、細菌性伝染病に対する宿主免疫細胞の応答性を調べる上で有用な実験モデル動物を提供するものである。非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNAを、BLASTサーチによりスクリーニングし、各種TLRと高い相似性を有する多くのESTクローンをスクリーニングし、これらをプローブにして、マウス・マクロファージcDNAライブラリーから完全長cDNAを単離し、cDNAの塩基配列を解析してLR及TIR領域などの保存領域が存在するTLR9であることを確認した後、ノックアウトマウスを作製し、TLR9が細菌DNAの非メチル化CpG配列を含むオリゴヌクレオチドの受容体タンパク質であることを確認した。

明 細 書

細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質

5 技術分野

本発明は、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質、該受容体タンパク質の遺伝子及びそれらの利用に関する。

10 背景技術

トール（Toll）遺伝子は、ショウジョウバエの胚発生中の背腹軸の決定（Cell 52, 269-279, 1988, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12, 393-416, 1996）、また成体における抗真菌性免疫応答に必要であることが知られている（Cell 86, 973-983, 1996）。かかるTollは、細胞外領域にロイシンリッチリピート（LRR）を有するI型膜貫通受容体であり、この細胞質内領域は、哺乳類インターロイキン-1受容体（IL-1R）の細胞質内領域と相同性が高いことが明らかとなっている（Nature 351, 355-356, 1991, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12, 393-416, 1996, J. Leukoc. Biol. 63, 650-657, 1998）。

近年、Toll様受容体（TLR）と呼ばれるTollの哺乳類のホモログが同定され、TLR2やTLR4など現在までに6つのファミリーが報告されている（Nature 388, 394-397, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 588-593, 1998, Blood 91, 4020-4027, 1998, Gene 231, 59-65, 1999）。このTLRファミリーは、上記IL-1Rと同様にアダプタータンパク質であるMyD88を介し、IL-1R結合キナーゼ（IRAK）をリクルートし、TRAF6を活性化し、下流のNF- κ Bを活性

化することが知られている (J. Exp. Med. 187, 2097-2101, 1998、Mol. Cell 2, 253-258, 1998、Immunity 11, 115-122, 1999)。また、哺乳類における TLR ファミリーの役割は、細菌の共通構造を認識するパターン認識受容体 (PRR : pattern recognition receptor) として、先天的な免疫認識に関わっているとも考えられている (Cell 91, 295-298, 1997)。

上記 PRR により認識される病原体会合分子パターン (PAMP : pathogen-associated molecular pattern) の一つは、グラム陰性菌の外膜の主成分であるリポ多糖 (LPS) であって (Cell 91, 295-298, 1997)、かかる LPS が宿主細胞を刺激して宿主細胞に TNF α 、IL-1 及び IL-6 等の各種炎症性サイトカインを産生させること (Adv. Immunol. 28, 293-450, 1979、Annu. Rev. Immunol. 13, 437-457, 1995) や、LPS 結合タンパク質 (LBP : LPS-binding protein) により捕獲された LPS が細胞表面上の CD14 に引き渡されることが知られている (Science 249, 1431-1433, 1990、Annu. Rev. Immunol. 13, 437-457, 1995)。本発明者らは、TLR4 のノックアウトマウスを作製し、TLR4 ノックアウトウスが上記グラム陰性菌の外膜の主成分である LPS に不応答性であること (J. Immunol. 162, 3749-3752, 1999) や、TLR2 ノックアウトマウスを作製し、TLR2 ノックアウトマウスのマクロファージがグラム陽性菌細胞壁やその構成成分であるペプチドグリカンに対する反応性が低下すること (Immunity, 11, 443-451, 1999) を報告している。

他方、細菌 DNA (バクテリア由来 DNA) や非メチル化 CpG 配列を含むオリゴヌクレオチドが、マウス及びヒトの免疫細胞を刺激すること (Trends Microbiol. 4, 73-76, 1996、Trends Microbiol. 6, 496-500, 1998) や、IL-12 及び IFN γ の放出に支配される T ヘルパー 1 細胞 (Th1) 様炎症性応答を刺激すること (EMBO J. 18, 6973-6982, 1999、

J. Immunol. 161, 3042-3049, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 9305-9310, 1999)から、C p G配列を含むオリゴヌクレオチドは、癌、アレルギー及び伝染病のワクチンを含むワクチン戦略のアジュバントとしての使用可能性が提唱されている(Adv. Immunol. 73, 329-368, 1999, 5 Curr. Opin. Immunol. 12, 35-43, 2000, Immunity 11, 123-129, 1999)。このように臨床実用において効果が期待されるにも関わらず、非メチル化C p G配列を含む細菌DNAが免疫細胞を活性化する分子メカニズムはよくわかっていない。

上記のように、メチル化されていないC p Gモチーフを含有するバク
10 テリア由来DNAは免疫細胞を非常に活性化し、T h 1の応答を誘導するが、その分子レベルでの活動はあまり理解されていない。本発明の課題は、細菌DNAの非メチル化C p G配列を含むオリゴヌクレオチドの分子レベルでの作用を明らかにすることができる、非メチル化C p G配列を有する細菌DNAを特異的に認識するT L Rファミリーのメンバー受
15 容体タンパク質T L R 9や、それをコードするDNAや、細菌性伝染病に対する宿主免疫細胞の応答性を調べる上で有用な実験モデル動物を提供することにある。

細菌の共通構造を認識するパターン認識受容体として、先天的な免疫認識に関わっている哺乳類におけるT L Rファミリーは、現在までに6
20 つのメンバー(T L R 1 - 6)が公表されており(Nature 388, 394-397, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 588-593, 1998, Gene 231, 59-65, 1999)、T L R 7及びT L R 8の新たな2つのメンバーがGenBankに登録されている(登録番号A F 2 4 0 4 6 7及びA F 2 4 6 9 7 1)。また、T L R 9についても完全長c DNAが見い出されGenBankに登録され
25 ている(登録番号A F 2 4 5 7 0 4)が、その機能については知られていなかった。

本発明者らは、非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する TLR ファミリーのメンバー受容体タンパク質をコードする DNA を、BLAST サーチによりスクリーニングし、既に同定されている各種 TLR と高い相似性を有する多くのシーケンス・タグ (EST) クローンをスクリーニングし、これらの遺伝子フラグメントをプローブにして、マウス・マクロファージ cDNA ライブラリーから完全な長さを有する cDNA を単離し、これを用いてヒト cDNA も単離した。次に、これら cDNA の塩基配列を解析し、この TLR ファミリーに LRR 及び TIR 領域などの保存領域が存在する TLR 9 であることを確認した。

5

10

そこで、この TLR 9 ノックアウトマウスを作製し、TLR 9 が細菌 DNA の非メチル化 CpG 配列を含むオリゴヌクレオチドの受容体タンパク質であることを明らかにし、本発明を完成するに至った。

発明の開示

15 すなわち本発明は、非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする DNA (請求項 1) や、非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質が、以下の (a) 又は (b) のタンパク質であることを特徴とする請求項 1 記載の DNA (a) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるタン

20

パク質 (b) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA に対して反応性を有するタンパク質 (請求項 2) や、配列番号 1 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むことを特徴とする

25

請求項 1 記載の DNA (請求項 3) や、請求項 3 記載の遺伝子を構成する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを特徴

とする請求項 1 記載の DNA（請求項 4）や、非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質が、以下の (a) 又は (b) のタンパク質であることを特徴とする請求項 1 記載の DNA (a) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質 (b) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA に対して反応性を有するタンパク質（請求項 5）や、配列番号 3 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むことを特徴とする請求項 1 記載の DNA（請求項 6）や、請求項 6 記載の遺伝子を構成する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを特徴とする請求項 1 記載の DNA（請求項 7）に関する。

また本発明は、非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質（請求項 8）や、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項 8 記載のタンパク質（請求項 9）や、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項 8 記載のタンパク質（請求項 10）や、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項 8 記載のタンパク質（請求項 11）や、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項 8 記載のタンパク質（請求項 12）に関する。

また本発明は、請求項 8～12 のいずれか記載のタンパク質と、マーカータンパク質及び／又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質（請求項 13）や、請求項 8～12 のいずれか記載のタンパク質と特異

的に適合する抗体（請求項１４）や、抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項１４記載の抗体（請求項１５）や、請求項８～１２のいずれか記載のタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞（請求項１６）に関する。

- ５ また本発明は、非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子が過剰発現することの特徴とする非ヒト動物（請求項１７）や、非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする非ヒト動物（請求項１８）や、
- 10 非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA に対して不反応性であることを特徴とする請求項１８記載の非ヒト動物（請求項１９）や、齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項１７～１９のいずれか記載の非ヒト動物（請求項２０）に関する。

- また本発明は、非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に
- 15 認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した細胞に、請求項１～７のいずれか記載の DNA を導入することの特徴とする非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA に対して反応性を有するタンパク質を発現する細胞の調製方法（請求項２１）や、請求項２１記載の非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受
- 20 容体タンパク質を発現する細胞の調製方法により得られることを特徴とする非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質を発現する細胞（請求項２２）に関する。

- また本発明は、被検物質の存在下、非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質を発現している細胞をインビトロで培養し、TLR 9 活性を測定・評価することを特徴とする非
- 25 メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タン

- パク質のアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法（請求項 23）や、非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞の TLR9 活性を測定・評価することを特徴とする非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法（請求項 24）や、非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子が過剰発現した非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞の TLR9 活性を測定・評価することを特徴とする非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法（請求項 25）や、非ヒト動物が、マウスであることを特徴とする請求項 24 又は 25 記載の非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA に対して反応性を有するタンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法（請求項 26）に関する。

- また本発明は、請求項 23～26 のいずれか記載の非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法により得られる非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニスト（請求項 27）や、非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質の全部又はその一部を有効成分として含有する医薬組成物（請求項 28）や、請求項 27 記載のアゴニスト又はアンタゴニストを有効成分として含有する医薬組成物（請求項 29）や、検体中の非メチル化 CpG 配列を有す

る細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNAと、請求項3記載のDNAとの塩基配列を比較することができる、請求項3記載のDNAを含むことを特徴とする非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNA
5 配列の欠失、置換及び／又は付加に関連する疾病の診断キット（請求項30）に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明のTLR9ノックアウトマウスと野生型マウスの遺伝子地図を示す図である。
10

第2図は、本発明のTLR9ノックアウトマウスのサザンブロット分析の結果を示す図である。

第3図は、本発明のTLR9ノックアウトマウスの脾臓細胞におけるノーザンブロット分析の結果を示す図である。

第4図は、本発明のTLR9ノックアウトマウスと野生型マウスのアミノ酸配列の比較結果を示す図である。
15

第5図は、本発明のTLR9ノックアウトマウス及び野生型マウスにおけるCpG ODN、PGN又はLPS誘導によるTNF α 、IL-6又はIL12の産生量の結果を示す図である。

第6図は、本発明のTLR9ノックアウトマウス及び野生型マウスにおけるCpG ODN又はLPS誘導による細胞増殖応答の結果を示す図である。
20

第7図は、本発明のTLR9ノックアウトマウス及び野生型マウスにおけるCpG ODN又はLPS誘導によるIL-12の産生量の結果を示す図である。
25

第8図は、本発明のTLR9ノックアウトマウス及び野生型マウスに

における CpG ODN 又は LPS 誘導による CD40、CD80、CD86 及び MHC クラス II の発現量の結果を示す図である。

第 9 図は、本発明の TLR9 ノックアウトマウス及び野生型マウスにおける CpG ODN 又は LPS 誘導による NF- κ B の活性化の結果
5 を示す図である。

第 10 図は、本発明の TLR9 ノックアウトマウス及び野生型マウスにおける CpG ODN 又は LPS 誘導による JNK の活性化の結果を示す図である。

第 11 図は、本発明の TLR9 ノックアウトマウス及び野生型マウス
10 における CpG ODN 又は LPS 誘導による IRAK の活性化の結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明における非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA としては、
15 T細胞、B細胞、抗原提示細胞等の免疫細胞を活性化し、免疫応答を誘導することができる、メチル化されていない CpG モチーフを有するオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) 等のバクテリアに由来する DNA であればどのようなものでもよく、エセリシア・コリ、クレブシェラ・ニューモニエ、シュードモナス・アエルギノサ、サルモネラ・チフィム
20 リウム、セラチア・マルセッセンス、フレクスナー赤痢菌、ビブリオ・コレレエ、サルモネラ・ミネソタ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、スタフィロコッカス・アウレウス、コリネバクテリウム・ジフテリア、ノカルジア・コエリアカ、ストレプトコッカス・ニューモニアなどのバクテリア由来の DNA を具体的に挙げることはできる。

25 かかる非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質としては、非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA

を特異的に認識することができるタンパク質であれば特に制限されるものではなく、例えば、配列表の配列番号 2 で示されるヒト由来の TLR 9 や、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ
5 上記非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識することができるタンパク質や、これらの組換えタンパク質を具体的に挙げる
ことができる。かかる非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質は、その DNA 配列情報等に基づき公知の方法で調製することができる。

- 10 また、本発明の非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする DNA としては、配列表の配列番号 2 で示されるヒト由来の TLR 9 をコードする DNA、例えば配列番号 1 で示されるものや、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配
15 列からなり、かつ上記非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識することができるタンパク質をコードする DNA や、これら DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ上記非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識することができるタンパク質をコードする DNA も包含され、これらはその DNA 配列情報
20 等に基づき、例えばマウス由来の TLR 9 においてはマウス RAW 264.7 cDNA ライブラリーや 129/SvJ マウス遺伝子ライブラリーなどから公知の方法により調製することができる。

- また、配列番号 1 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部又は全部をプローブとして、マウス由来の DNA ライ
25 ブラリーに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションを行ない、該プローブにハイブリダイズする DNA を単離することにより、

受容体タンパク質 T L R 9 と同効な目的とする免疫誘導非メチル化 C p G 配列を有する細菌 D N A を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする D N A を得ることもできる。かかる D N A を取得するためのハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、42℃でのハイブリダイゼーション、及び 1 × S S C、0.1%の S D S を含む緩衝液による 42℃での洗浄処理を挙げることができ、65℃でのハイブリダイゼーション、及び 0.1 × S S C、0.1%の S D S を含む緩衝液による 65℃での洗浄処理をより好ましく挙げることができる。なお、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響を与える要素としては、上記温度条件以外に種々の要素があり、当業者であれば、種々の要素を適宜組み合わせ、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジエンシーと同等のストリンジエンシーを実現することが可能である。

本発明の融合タンパク質とは、マウス、ヒト等の非メチル化 C p G 配列を有する細菌 D N A を特異的に認識する受容体タンパク質に、マーカータンパク質及び／又はペプチドタグを結合させたものをいい、マーカータンパク質としては、従来知られているマーカータンパク質であればどのようなものでもよく、例えば、アルカリフォスファターゼ、抗体の F c 領域、H R P、G F P などを具体的に挙げることができ、また本発明におけるペプチドタグとしては、M y c タグ、H i s タグ、F L A G タグ、G S T タグなどの従来知られているペプチドタグを具体的に例示することができる。かかる融合タンパク質は、常法により作製することができ、N i - N T A と H i s タグの親和性を利用した非メチル化 C p G 配列を有する細菌 D N A を特異的に認識する受容体タンパク質の精製や、非メチル化 C p G 配列を有する細菌 D N A を特異的に認識する受容体タンパク質の検出や、非メチル化 C p G 配列を有する細菌 D N A を特異的に認識する受容体タンパク質に対する抗体の定量や、その他当該分

野の研究用試薬としても有用である。

本発明の非メチル化 C p G 配列を有する細菌 D N A を特異的に認識する受容体タンパク質に特異的に結合する抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等の免疫特異的な抗体を具体的に挙げることができ、これらは上記非メチル化 C p G 配列を有する細菌 D N A を特異的に認識する受容体タンパク質を抗原として用いて常法により作製することができるが、その中でもモノクローナル抗体がその特異性の点でより好ましい。かかるモノクローナル抗体等の非メチル化 C p G 配列を有する細菌 D N A を特異的に認識する受容体タンパク質に特異的に結合する抗体は、例えば、T L R 9 の変異又は欠失に起因する疾病の診断や T L R 9 の制御分子機構を明らかにする上で有用である。

非メチル化 C p G 配列を有する細菌 D N A を特異的に認識する受容体タンパク質に対する抗体は、慣用のプロトコールを用いて、動物（好ましくはヒト以外）に該非メチル化 C p G 配列を有する細菌 D N A を特異的に認識する受容体タンパク質若しくはエピトープを含む断片、又は該タンパク質を膜表面に発現した細胞を投与することにより産生され、例えばモノクローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたらす、ハイブリドーマ法（Nature 256, 495-497, 1975）、トリオーマ法、ヒト B 細胞ハイブリドーマ法（Immunology Today 4, 72, 1983）及び E B V - ハイブリドーマ法（MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp.77-96, Alan R.Liss, Inc., 1985）など任意の方法を用いることができる。以下に非メチル化 C p G 配列を有する細菌 D N A を特異的に認識する受容体タンパク質として、マウス由来の T L R 9 を例に挙げてマウス由来の T L R 9 に対して特異的に結合するモノクローナル抗体、すなわち抗 m T L R 9 モノクローナル抗体の作製

方法を説明する。

上記抗mTLR9モノクローナル抗体は、抗mTLR9モノクローナル抗体産生ハイブリドーマをインビボ又はインビトロで常法により培養することにより生産することができる。例えば、インビボ系においては、
5 齧歯動物、好ましくはマウス又はラットの腹腔内で培養することにより、またインビトロ系においては、動物細胞培養用培地で培養することにより得ることができる。インビトロ系でハイブリドーマを培養するための培地としては、ストレプトマイシンやペニシリン等の抗生物質を含むRPMI 1640又はMEM等の細胞培養培地を例示することができる。

- 10 抗mTLR9モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、例えば、マウス等から得られた受容体タンパク質TLR9を用いてBALB/cマウスを免疫し、免疫されたマウスの脾臓細胞とマウスNS-1細胞(ATCC TIB-18)とを、常法により細胞融合させ、免疫蛍光染色パターンによりスクリーニングすることにより、抗mTLR9モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作出することができる。また、かかる
15 モノクローナル抗体の分離・精製方法としては、タンパク質の精製に一般的に用いられる方法であればどのような方法でもよく、アフィニティークロマトグラフィー等の液体クロマトグラフィーを具体的に例示することができる。

- 20 また、本発明の上記非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質に対する一本鎖抗体をつくるためには、一本鎖抗体の調製法（米国特許第 4,946,778 号）を適用することができる。また、ヒト化抗体を発現させるために、トランスジェニックマウス又は他の哺乳動物等を利用したり、上記抗体を用いて、その非メチル化
25 CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を発現するクローンを単離・同定したり、アフィニティークロマトグラフ

ィーでそのポリペプチドを精製することもできる。非メチル化C p G配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質に対する抗体は、非メチル化C p G配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質の分子機構を明らかにする上で有用である。

- 5 また上記抗m T L R 9モノクローナル抗体等の抗体に、例えば、F I T C（フルオレセインイソシアネート）又はテトラメチルローダミンイソシアネート等の蛍光物質や、¹²⁵I、³²P、³⁵S又は³H等のラジオアイソトープや、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ又はフィコエリトリン等の酵素で標識したものや、グリー
- 10 ン蛍光タンパク質（G F P）等の蛍光発光タンパク質などを融合させた融合タンパク質を用いることによって、上記非メチル化C p G配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質の機能解析を行うことができる。また免疫学的測定方法としては、R I A法、E L I S A法、蛍光抗体法、プラーク法、スポット法、血球凝集反応法、オクタ
- 15 ロニー法等の方法を挙げることができる。

- 本発明はまた、上記非メチル化C p G配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞に関する。かかる非メチル化C p G配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子の宿主細胞
- 20 への導入は、Davis ら（BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986）及び Sambrook ら（MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989）などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、D
- 25 E A Eーデキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション（transvection）、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トラン

スフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープローディング (scrape loading)、弾丸導入(ballistic introduction)、感染等により行うことができる。そして、宿主細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等の細菌
5 原核細胞や、酵母、アスペルギルス等の真菌細胞や、ドロソフィラ S 2、スポドプテラ S f 9 等の昆虫細胞や、L 細胞、CHO 細胞、COS 細胞、HeLa 細胞、C 1 2 7 細胞、BALB/c 3 T 3 細胞（ジヒドロ葉酸レダクターゼやチミジンキナーゼなどを欠損した変異株を含む）、BHK 2 1 細胞、HEK 2 9 3 細胞、Bowes メラノーマ細胞、卵母細胞等
10 の動植物細胞などを挙げることができる。

また、発現系としては、上記非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質を宿主細胞内で発現させることができる発現系であればどのようなものでもよく、染色体、エピソーム及びウイルスに由来する発現系、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プ
15 ラスミド由来、SV40 のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを
20 挙げることができる。これら発現系は、発現を起こさせるだけでなく、発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。

上記発現系を含んでなる宿主細胞やかかる細胞の細胞膜、またかかる細胞を培養して得られる非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質は、後述するように本発明のスクリー
25 ニング方法に用いることができる。例えば、細胞膜を得る方法としては、F. Pietri-Rouxel (Eur. J. Biochem., 247, 1174-1179, 1997) らの方法な

どを用いることができ、また、かかる非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質を細胞培養物から回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法、好ましくは、高速液体クロマトグラフィーが用いられる。特に、アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、抗 TLR 9 モノクローナル抗体等の抗非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質抗体を結合させたカラムや、上記 TLR 9 等の非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質に通常のペプチドタグを付加した場合は、このペプチドタグに親和性のある物質を結合したカラムを用いることにより、これらの非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質を得ることができる。

本発明において、上記非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子が過剰発現する非ヒト動物とは、野生型非ヒト動物に比べてかかる非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質を大量に産生する非ヒト動物をいい、また、非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物とは、染色体上の非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子の一部若しくは全部が破壊・欠損・置換等の遺伝子変異により不活性化され、非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する

受容体タンパク質を発現する機能を失なった非ヒト動物をいう。そして、本発明における非ヒト動物としては、ウサギや、マウス、ラット等の齧歯目動物などの非ヒト動物を具体的に挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

- 5 また、本発明において非メチル化C p G配列を有する細菌DNAに対して不反応性とは、細菌DNAによる刺激に対する生体又は生体を構成する細胞、組織若しくは器官の反応性が低下しているか、あるいはほぼ失われていることを意味する。したがって、本発明において非メチル化C p G配列を有する細菌DNAに対して不反応性の非ヒト動物とは、細菌DNAによる刺激に対して、生体又は生体を構成する細胞、組織若しくは器官の反応性が低下しているか、あるいはほぼ失われているマウス、ラット、ウサギ等のヒト以外の動物をいう。また、細菌DNAによる刺激としては、細菌DNAを生体に投与するインビボでの刺激や、生体から分離された細胞に細菌DNAを接触させるインビトロでの刺激等を挙げることができる。具体的には、TLR 9ノックアウトマウス等のTLR 9遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物を挙げることができる。
- 10
- 15

- ところで、メンデルの法則に従い出生してくるホモ接合体非ヒト動物には、非メチル化C p G配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質欠損型又は過剰発現型とその同腹の野生型とが含まれ、これらホモ接合体非ヒト動物における欠損型又は過剰発現型とその同腹の野生型を同時に用いることによって個体レベルで正確な比較実験をすることができることから、野生型の非ヒト動物、すなわち非メチル化C p G配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物と同種の動物、さらには同腹の動物を、例えば下記に記載する本発明のスクリーニングに際して併用することが好ましい。かかる非メチル化C p G
- 20
- 25

配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物の作製方法を、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質のノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを例
5 にとって以下説明する。

例えば、TLR9等の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したマウス、すなわち非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質ノックアウトマウスは、マウス遺伝
10 子ライブラリーからPCR等の方法により得られた遺伝子断片を用いて、上記非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングし、スクリーニングされた非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子をウイルスベクター等を用いてサブ
15 クローンし、DNAシーケンシングにより特定する。このクローンの非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子の全部又は一部をpMC1ネオ遺伝子カセット等に置換し、3'末端側にジフテリアトキシンAフラグメント(DT
20 k)遺伝子等の遺伝子を導入することによって、ターゲットベクターを作製する。

この作製されたターゲティングベクターを線状化し、エレクトロポレーション（電気穿孔）法等によってES細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、G418やガンシクロピア（GAN
25 NC）等の抗生物質により相同的組換えを起こしたES細胞を選択する。また、この選択されたES細胞が目的とする組換え体かどうかをサザン

プロット法等により確認することが好ましい。その確認されたES細胞のクローンをマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型のマウスとインタークロスさせると、ヘテロ接合体マウスを得ることができ、また、このヘテロ接合体マウスをインタークロスさせることによって、本発明の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質ノックアウトマウスを作製することができる。また、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質ノックアウトマウスが生起しているかどうかを確認する方法としては、例えば、上記の方法により得られたマウスからRNAを単離してノーザンプロット法等により調べたり、またこのマウスの発現をウエスタンプロット法等により調べる方法がある。

また、作出されたTLR9ノックアウトマウスが非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して不応答性であることは、例えば、CpG ODNをTLR9ノックアウトマウスのマクロファージ、単核細胞、樹状細胞などの免疫細胞にインビトロ又はインビボで接触せしめ、かかる細胞におけるTNF- α 、IL-6、IL-12、IFN- γ 等の産生量や、脾臓B細胞の増殖応答や、脾臓B細胞表面でのCD40、CD80、CD86、MHCクラスII等の抗原の発現量や、NF- κ B、JNK、IRAK等のTLR9のシグナル伝達経路における分子の活性化を測定することにより確認することができる。そして、本発明のTLR9ノックアウトマウスは、非メチル化CpG配列を有する細菌DNA等の作用機序の解明や細菌感染に対するワクチン開発に有用なモデルとすることができる。

非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質のトランスジェニックマウスは、TLR9等の非メチル化C

p G 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする c DNA にチキン β -アクチン、マウスニューロフィラメント、SV 40 等のプロモーター、及びラビット β -グロビン、SV 40 等のポリ A 又はイントロンを融合させて導入遺伝子を構築し、該導入遺伝子をマウス受精卵の前核にマイクロインジェクションし、得られた卵細胞を培養した後、仮親のマウスの輸卵管に移植し、その後被移植動物を飼育し、産まれた仔マウスから前記 c DNA を有する仔マウスを選択することによりかかるトランスジェニックマウスを創製することができる。また、c DNA を有する仔マウスの選択は、マウスの尻尾等より粗 DNA を抽出し、導入した非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子をプローブとするドットハイブリダイゼーション法や、特異的プライマーを用いた PCR 法等により行うことができる。

また、本発明の非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする DNA の全部あるいは一部を用いると、非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質の欠失又は異常に起因する疾病等の遺伝子治療に有効な細胞を調製することができる。本発明におけるこれら細胞の調製方法としては、非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した細胞に、上記本発明の DNA の全部あるいは一部をトランスフェクション等により導入し、非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質を発現する細胞を得る方法を挙げることができ、特に、かかる非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質を発現する細胞としては、上記 DNA 等が染色体にインテグレートされ、ステイブルに TLR 9 活性を示す細胞を用いる

ことが好ましい。

- そしてまた、上記非メチル化 C p G 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする DNA、非メチル化 C p G 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質とマーカー
- 5 タンパク質及び／又はペプチドタグとを結合させた融合非メチル化 C p G 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質に対する抗体、非メチル化 C p G 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞、
- 10 非メチル化 C p G 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子が過剰発現する非ヒト動物、非メチル化 C p G 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物、非メチル化 C p G 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質を発現する細胞等を用いると、本発明の非メチル化 C p G 配列を有する細菌 D
- 15 NA を特異的に認識する受容体タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストや、非メチル化 C p G 配列を有する細菌 DNA に対する反応性の抑制物質又は促進物質をスクリーニングすることができる。これらのスクリーニングにより得られたものは、細菌感染症に対する抑制物質又は促進物質や、アレルギー性疾患若しくは癌に対する抑制剤、予防剤又は治療薬や、遺伝子治療等において副作用を抑制剤又は阻害剤や、T L R 9 活性の欠失又は異常に起因する疾病等の診断・治療に有用な物質である可能性がある。
- 20

- 上記 T L R 9 活性とは、非メチル化 C p G 配列を有する細菌 DNA と特異的に反応し、細胞内にシグナルを伝達する機能をいい、シグナル伝達機能としては、T N F - α 、I L - 6、I L - 1 2、I F N - γ 等の
- 25 サイトカインを産生する機能や、亜硝酸イオンを産生する機能や、細胞

を増殖する機能や、細胞表面においてCD40、CD80、CD86、MHCクラスII等の抗原を発現する機能や、NF- κ B、JNK、IRAK等のTLR9のシグナル伝達経路における分子を活性化させる機能などを具体的に例示することができるが、これらに限定されるものではない。

本発明の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法としては、被検物質の存在下、マクロファージ、脾臓細胞又は樹状細胞などの免疫細胞、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を発現している細胞、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を発現する細胞等の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質を発現している細胞をインビトロで培養し、TLR9活性を測定・評価する方法や、野生型非ヒト動物、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物、又は、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子が過剰発現した非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物から得られるマクロファージ、脾臓細胞、又は樹状細胞などの免疫細胞のTLR9活性を測定・評価する方法等を具体的に挙げるができる。

また、マクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価するに際し、対照として野生型非ヒト動物、特に同腹の野生型非ヒト動物の測定値と比較・評価することが個体差によるバラツキをなくすることができるので好ましい。このことは、以下に示す非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対する反応性の抑制物質又は促進物質のスクリーニ

ングにおいても同様である。

また、非メチル化C p G配列を有する細菌DNAに対する反応性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法としては、被検物質と非メチル化C p G配列を有する細菌DNAとの存在下、非メチル化C p G配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質、又は該タンパク質を発現している細胞膜をインビトロでインキュベーションし、該タンパク質との反応性を測定・評価する方法や、非メチル化C p G配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞と被検物質とをあらかじめインビトロで接触せしめた後、該マクロファージ又は脾臓細胞を非メチル化C p G配列を有する細菌DNAの存在下で培養し、該マクロファージ若しくは脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価する方法や、非メチル化C p G配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞と非メチル化C p G配列を有する細菌DNAとをあらかじめインビトロで接触せしめた後、該マクロファージ又は脾臓細胞を被検物質の存在下で培養し、該マクロファージ若しくは脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価する方法や、非メチル化C p G配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞を非メチル化C p G配列を有する細菌DNAの存在下で培養し、該マクロファージ若しくは脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価する方法や、非メチル化C p G配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質をコードする遺伝

子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物を細菌により感染させ、該非ヒト動物から得られるマクロファージ若しくは脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価する方法や、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物をあらかじめ細菌により感染させた後、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞を被検物質の存在下で培養し、該マクロファージ若しくは脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価する方法や、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物から得られるマクロファージ若しくは脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価する方法や、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物を細菌により感染させ、該非ヒト動物におけるマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価する方法や、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物をあらかじめ細菌により感染させた後、該非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物におけるマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価する方法などを具体的に挙げることができる。また、これらのスクリーニング方法に用いる非メチル化CpG配列を有する細菌DNAとしては、CpG ODN (TCC-ATG-ACG-TTC-CTG-ATG-C

25 T: 配列番号5) を用いることが好ましいが、これに限定されるのもで

はない。

本発明はまた、検体中の非メチル化C p G配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNA配列を、本発明の非メチル化C p G配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体

5 タンパク質をコードするDNA配列と比較することからなる、非メチル化C p G配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質の活性又は発現と関連する疾病の診断に用いられる診断キットに関する。

非メチル化C p G配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNAの変異型の検出は、遺伝子に変異がある個

10 体をDNAレベルで見い出すことにより行うことができ、非メチル化C p G配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質の過少発現、過剰発現又は変異発現により生ずる疾病の診断に有効である。

かかる検出に用いられる検体としては、被験者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織等の生検から得ることができるゲノムDNAや、RNA又は

15 cDNAを具体的に挙げることができるがこれらに限定されるものではなく、かかる検体を使用する場合、PCR等により増幅したものを用いることもできる。そして、塩基配列の欠失や挿入変異は、正常な遺伝子型と比較したときの増幅産物のサイズの変化により検出でき、また点突然変異は増幅DNAを標識非メチル化C p G配列を有する細菌DNAを

20 特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子とハイブリダイズさせることで同定することができる。このように、非メチル化C p G配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子の変異を検出することで、非メチル化C p G配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質の活性又は発現と関連する

25 疾病の診断又は判定をすることができる。

本発明はまた、非メチル化C p G配列を有する細菌DNAを特異的に

認識する受容体タンパク質をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部からなる非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質の活性又は発現と関連する疾患の診断用プローブ、及び当該プローブ及び／又は本発明の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質に特異的に結合する抗体を含有してなる非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質の活性又は発現と関連する疾患の診断キットに関する。前記診断用プローブとしては、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNA（cDNA）又はRNA（cRNA）のアンチセンス鎖の全部又は一部であり、プローブとして成立する程度の長さ（少なくとも20ベース以上）を有するものであれば特に制限されるものではない。かかるプローブ及び／又は本発明の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質に特異的に結合する抗体を細菌感染症等のような症状の疾患の診断薬の有効成分とするためには、プローブが分解されないような適当なバッファー類や滅菌水に溶解することが好ましい。また、これらの診断薬を用いた、免疫染色法（Dev. Biol. 170, 207-222, 1995、J. Neurobiol. 29, 1-17, 1996）や、In situ ハイブリダイゼーション法（J. Neurobiol. 29, 1-17, 1996）や、in situ PCR法等の方法により細菌感染症等のような症状の疾患を診断することもできる。

本発明の医薬組成物としては、TLR 9等の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質の全部又はその一部や、上記受容体タンパク質のアゴニストやアンタゴニストを含むものであれば、どのようなものでもよい。具体的には、細菌感染症に対するワクチンや、癌に対するワクチンや、気管支喘息をはじめとするアレ

ルギー疾患の治療薬や、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた治療や遺伝子治療において障害となる CpGモチーフの存在による副作用の克服剤・抑制剤・阻害剤などを挙げることができる。

前記のように、本発明の非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を
5 特異的に認識する受容体タンパク質をコードする DNA 配列の欠失、置換及び／又は付加に関連する疾病の診断キットとしては、TLR9 をコードする DNA を含むものであればどのようなものでもよく、かかる TLR9 をコードする DNA と検体中の非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする DNA との
10 塩基配列を比較することにより、非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする DNA 配列の欠失、置換及び／又は付加に関連する疾病、例えば、癌、アレルギー、伝染病等の診断が可能となる。

以下に、実施例を挙げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発
15 明の技術的範囲はこれら実施例により限定されるものではない。

実施例 1 (TLR9 のクローニング)

ヒト TLR4 の DNA 配列情報を用いて、GenBank をサーチした結果、相同性がきわめて高いマウス EST (登録番号 AA273731 ; マウス) を見い出した。このマウス EST の PCR 増幅産物をプローブ
20 として、マウス RAW264.7 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、完全な TLR9 オープンリーディングフレームを含む配列番号 3 に示される完全長の cDNA クローンを単離した。このマウス TLR9 の DNA 配列情報を用いて GenBank をサーチし、高い相同性を有するヒトゲノム配列を見い出した。このヒトゲノム配列に基づいて、cDNA
25 A 端部を増幅し、U937 細胞 (J. Immunol. 163, 5039-5048, 1999) から、配列番号 1 に示される塩基配列を有する完全長のヒト TLR9 の c

DNAを単離した。

実施例2 (TLR9ノックアウトマウスの作製)

- 129/SvJマウス遺伝子ライブラリー (ストラタジーン社製) からTLR9ゲノムDNAを単離し、pBluescript II SK(+)ベクター (ストラタジーン社製) 中でサブクローンし、制限酵素マッピング及びDNA
5 配列決定により特定した。ターゲッティングベクターは、LRR (ロイシンリッチリピート) 領域の一部分をコードする1.0kbのフラグメントを、ネオマイシン耐性遺伝子カセット (pMC1-neo; ストラタジーン社製) に置換し、負の選択マーカーとして単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼ (HSV-TK) を挿入することにより構築した (図1)。
10 このターゲッティングベクターを線状化し、胎生14.1日目の胚幹細胞 (ES細胞) にエレクトポレーションし、G418及びガンシクロピアに抵抗性を示す292個のクローンを選択し、PCR法及びサザンブロット法により14個のクローンをスクリーニングした。
15 突然変異TLR9対立遺伝子を含有していた3個の標的ESクローンを、C57BL/6マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションしキメラマウスを作製した。この雄のキメラマウスをC57BL/6雌マウスと交配させ、ヘテロ接合体F1マウスを作製し、かかるヘテロ接合体F1マウスをインタークロスすることによってホモ接合体マウス (TLR9ノックアウトマウス: TLR9^{-/-}) を得た (図2)。なお、ホモ接合体マウスの確認は、マウスの尾から抽出した各ゲノムDNAをScaIでダイジェストし、図1に示すプローブを用いたサザンブロット法により行った。本発明のTLR9ノックアウトマウス (TLR9^{-/-}) はメンデルの法則に従い作製することができ、12週目までは顕著な異常
20 を示さなかった。
25

突然変異によりTLR9遺伝子の不活性化が生起していることを確認

するため、野生型マウス (+/+) 及び TLR9 ノックアウトマウス (-/-) の脾臓細胞から抽出した全 RNA (10 μ g) を電気泳動にかけナイロン膜に移して、[³²P] で標識した TLR9 の C-末端フラグメント若しくは N-末端フラグメント、又は β -アクチン (β -actin) に特異的な cDNA を用いてノーザンブロット分析を行った (図 3)。
これらの結果から、TLR9 mRNA の N-末端フラグメントは TLR9 ノックアウトマウスの脾臓細胞からは検出されなかった。また、C-末端フラグメントをプローブとした場合、変異マウス由来の Tlr9 の転写は野生型マウス由来のものとはほぼ同じサイズのものが検出されたが、生産量においては少ないことがわかった。そこで、変異マウスから得られた脾臓細胞の mRNA を用いて RT-PCR 法を行い、得られた生成物の配列分析を行った。この結果、転写された Tlr9 遺伝子には neo 遺伝子が含まれており、この neo の挿入によって、TLR9 の N-末端部位にストップコドンが出現し、変異マウスにおいて機能的な TLR9 タンパク質が発現しないことがわかった (図 4)。なお、TLR9 ノックアウトマウスのリンパ細胞をフローサイトメトリーで測定した結果、異常成分は見られなかった。

実施例 3 (腹腔マクロファージの調製)

野生型マウス (wild-type) 及び TLR9 ノックアウトマウス (TLR9^{-/-}) のそれぞれの腹腔内に 4% のチオグリコール酸培地 (DIFCO 社製) を 2 ml ずつ注入し、3 日後に各マウスの腹腔内から腹膜滲出細胞を単離し、これらの細胞を 10% のウシ胎仔血清 (GIBCO 社製) を添加した RPMI 1640 培地 (GIBCO 社製) 中で 37℃ にて 2 時間培養し、氷温のハンクス緩衝液 (Hank's buffered salt solution: HBSS; GIBCO 社製) で洗浄することにより非付着細胞を取り除き、付着細胞を腹膜マクロファージとして以下の実験に使用

した。

実施例 4 (TLR 9 ノックアウトマウスの非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA に対する応答性)

最近、CpG ODN (oligodeoxynucleotide) の応答性は、TLR を介するシグナル伝達経路の中のアダプタータンパク質である MyD88 に依存していることが明らかになった。この MyD88 ノックアウトマウスは CpG ODN に対して応答しないが、TLR 2 ノックアウトマウスや TLR 4 ノックアウトマウスは正常に CpG ODN に対して応答する。これらのことは、CpG ODN が TLR 2 及び TLR 4 以外の TLR によって認識されることを示している。そこで、TLR 9 ノックアウトマウスの CpG ODN に対する応答性を調べてみた。まず、腹腔マクロファージにおける炎症性サイトカインの産生量を以下のように測定した。

実施例 3 により調製した各腹膜マクロファージを $\text{INF } \gamma$ (30 unit/ml) の存在下又は非存在下において、図 5 に示された各種濃度の CpG ODN (0.1 又は $1.0 \mu\text{M}$; TIB MOLBIOL 社製; TCC-ATG-ACG-TTC-CTG-ATG-CT)、PGN ($10 \mu\text{g/ml}$; Sigma and Fluka 社製; スタフィロコッカス・アウレウス由来)、LPS ($1.0 \mu\text{g/ml}$; Sigma 社製; サルモネラ・ミネソタ Re-595 由来) といっしょに 24 時間培養した。培養後、培養上清中の $\text{TNF } \alpha$ 、IL-6 及び IL-12 p40 の各濃度を ELISA 法により測定した。この結果を図 5 に示す。これらの結果から、野生型マウス (Wild-type) のマクロファージは CpG ODN に応答して $\text{TNF } \alpha$ 、IL-6 及び IL-12 を産生し、さらに $\text{INF } \gamma$ 及び CpG ODN で刺激すると、 $\text{TNF } \alpha$ 、IL-6 及び IL-12 の産生量が増加することがわかった。しかし、TLR 9 ノックアウトマウ

ス (TLR9^{-/-}) 由来のマクロファージは、IFN γ の存在下でさえ、CpG ODNに対する応答において検出可能なレベルの炎症性サイトカインを産生していなかった。また、野生型マウス及びTLR9ノックアウトマウス由来のマクロファージは、LPS又はPGNに対する応答によりTNF α 、IL-6及びIL-12をほぼ同程度産生することがわかった (図5)。なお、それぞれの実験結果はn=3の平均値を示す。図中のN.D. は検出できなかったことを示す。

また、CpG ODN又はLPSに対する野生型マウス (Wild type) 及びTLR9ノックアウトマウス (TLR9^{-/-}) の脾臓細胞の応答性について調べてみた。それぞれのマウスの脾臓細胞 (1 \times 10⁵) を単離し、図6に示す各種濃度のCpG ODN又はLPSにより96ウェルプレート内で培養して脾臓細胞を刺激した。培養から40時間後に1 μ Ciの [³H] -チミジン (デュポント社製) を添加して更に8時間培養し、 [³H] の摂取量を β シンチレーションカウンター (パカード社製) で測定した (図6)。この結果から、野生型マウスの脾臓細胞では、CpG ODNやLPSの投与量に依存して細胞増殖反応を促進していたが、TLR9ノックアウトマウスの脾臓細胞では、いかなる濃度のCpG ODN刺激においてもCpG ODNによる細胞増殖反応は見られなかった。また、CpG ODNに応答して、野生型マウス由来のB細胞表面の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラスIIの発現が増加した。しかし、TLR9ノックアウトマウス由来のB細胞ではCpG ODNに誘導されたMHCクラスIIの発現の増加は見られなかった。以上のことから、TLR9ノックアウトマウスのマクロファージやB細胞は、CpG ODNに対する応答性を特異的に欠如していることがわかった。

次に、CpG ODNを含有するバクテリア由来DNAは樹状細胞を

潜在的に刺激し、T h 1 細胞の発達をサポートすることが知られている
(EMBO J. 18, 6973-6982, 1999、J. Immunol. 161, 3042-3049, 1998、
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 9305-9310, 1999)。そこでC p G O D
N誘導サイトカインの産生と、骨髄由来の樹状細胞の表面分子のアップ
レギュレーションを分析した。野生型マウス (W i l d - t y p e) 又
5 はT L R 9 ノックアウトマウス (T L R 9 ^{-/-}) の骨髄細胞を、1 0 n
g / m l のマウス顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
(Peprotech 社製) を含む1 0 %のウシ胎仔血清を添加したR P M I 1
6 4 0 培地で培養し (J. Exp. Med. 176, 1693-1702, 1992)、培養後6 日
10 目に未成熟の樹状細胞を回収し、0 . 1 μ M のC p G O D N 又は0 .
1 μ g / m l のL P S の存在下若しくは非存在下において、1 0 %のウ
シ胎仔血清を添加したR P M I 1 6 4 0 培地中で2 日間培養した。培養
後、上清中のI L - 1 2 p 4 0 の濃度をE L I S A 法で測定した (図
7)。この結果から、野生型マウス由来の樹状細胞はC p G O D N に応
15 答してI L - 1 2 を産生したが、T L R 9 ノックアウトマウス由来の樹
状細胞においては、C p G O D N はI L - 1 2 の産生を誘導しなかつ
た。

上記1 0 n g / m l のマウス顆粒球マクロファージコロニー刺激因
子 (Peprotech 社製) を含む1 0 %のウシ胎仔血清を添加したR P M I
20 1 6 4 0 培地で培養し、6 日目に回収された樹状細胞を、C D 4 0、C
D 8 0、C D 8 6 及びM H C クラス II に対する、それぞれのビオチン化
抗体により染色し、フィコエリトリン (p h y c o e r y t h r i n :
P E ; ファーミンジェン社製) で標識したストレプトアビジンで発展さ
せ、これらの細胞をセルクエストソフトウェア (ベクトンディッキンソ
ン社製) により蛍光活性化セルソーターキャリバー (FACS Calibur) で
25 分析した (図 8)。この結果から、C p G O D N で刺激すると、野生型

マウス由来の樹状細胞表面においては、CD40、CD80、CD86及びMHCクラスIIの発現を促進していたが、TLR9ノックアウトマウス由来の樹状細胞表面では、CpG ODNに対する応答によりこれらの分子の発現を促進しなかった(図8)。LPSによる刺激では、野生型マウス由来の樹状細胞もTLR9ノックアウトマウス由来の樹状細胞も同様の応答がみられた。以上の結果から、TLR9はCpG ODNの細胞応答に不可欠な受容体であることがわかった。

実施例5 (TLR9ノックアウトマウス由来のマクロファージのCpG ODNに対する応答によるNF- κ B、JNK及びIRAKの活性化)

- 10 TLRのシグナルは、アダプター分子であるMyD88を介してセリン/トレオニンキナーゼであるIRAKを活性化し、次いでMAPキナーゼ及びNF- κ Bを活性化することが知られている(Immunity 11, 115-122, 1999)。そこでCpG ODNが、かかる細胞内シグナル伝達分子を活性化するかどうかを調べてみた。実施例3により調製した野生型マウス及びTLR9ノックアウトマウスの腹腔マクロファージ(1×10^6 cells)を、 $1.0 \mu\text{M}$ のCpG ODN又は $1.0 \mu\text{g/ml}$ のサルモネラ・ミネソタRe-595のLPSで図9に示された時間刺激し、各マウスのマクロファージから核蛋白質を抽出し、NF- κ BのDNA結合部位を含む特異的プローブといっしょにインキュベートし、電気泳動を行い、オートラジオグラフィーにより視覚化した(図9)。
- 15
- 20

- この結果から、CpG ODNで刺激すると、野生型マウス由来のマクロファージではNF- κ BのDNA結合活性が増加するのに対し、TLR9ノックアウトマウス由来のマクロファージではNF- κ BのDNA結合活性は増加しなかった。TLR9ノックアウトマウス由来のマクロファージをLPSで刺激したものは、野生型マウス由来のマクロファージをLPSで刺激したものと同様のNF- κ Bの活性化が見られた。
- 25

以上の結果から、CpG ODNの誘導によるNF- κ Bの活性がTLR9ノックアウトマウス由来のマクロファージにおいて特異的に欠損していることがわかる。なお、図中の矢印はNF- κ Bと特異的プローブとの複合物の位置を示し、矢頭は特異的プローブのみの位置を示している。

上記と同様に図10又は図11で示された時間、CpG ODN又はLPSで刺激した野生型マウス及びTLR9ノックアウトマウスのマクロファージを、溶解緩衝液（最終濃度で1.0%のトリトンX-100、137mMのNaCl、20mMのトリス-HCl、5mMのEDTA、10%のグリセロール、1mMのPMSF、20 μ g/mlのアプロチニン、20 μ g/mlのロイペプチン、1mMのNa₃VO₄及び10mMの β -グリセロリン酸を含有する緩衝液；pH8.0）中にて溶解し、この細胞溶解物を抗JNK抗体（サンタクルス社製）又は抗IRAK抗体（林原生化学研究所株式会社製）で免疫沈降して、文献（Immunity 11, 115-122, 1999）記載のように、インビトロキナーゼアッセイを行い、GST-c-Jun溶解蛋白質（GST-c-Jun）を基質としたJNK活性及びIRAKの活性を測定した（図10, 11における上段；GST-c-Jun, Auto）。

また、上記細胞溶解物を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離させ、ニトロセルロース膜に移し、この膜を抗JNK抗体（サンタクルス社製）又は抗IRAK抗体（Transduction Laboratories 社製）でプロットして、エンハンスド・ケミルミネッセンス装置（デュボント社製）を使用して視覚化した（図10, 11における下段；WB）。以上の結果から、CpG ODNは野生型マウス由来のマクロファージのJNK及びIRAKを活性化するが、TLR9ノックアウトマウス由来のマクロファージでは全く活性化しないことがわかった（図10, 1

1)。したがって、CpG ODNを介する情報伝達はTLR9に依存していることがわかった。

産業上の利用可能性

- 5 メチル化されていないCpGモチーフを含有するバクテリア由来DNAは免疫細胞を非常に活性化し、Th1の応答を誘導するが、そのバクテリア由来DNAを認識する受容体は知られていなかった。本発明により、細菌DNAの非メチル化CpG配列を含むオリゴヌクレオチドの受容体が明らかとなったことから、非メチル化CpG配列を有する細菌DNA
- 10 NAを特異的に認識するTLRファミリーのメンバー受容体タンパク質TLR9や、それをコードする遺伝子DNA等は、細菌性疾病等の診断や、治療に用いることができ、またTLR9ノックアウト動物を用いると、バクテリア由来DNAの分子レベルにおける作用機作を明らかにすることが可能となる。

請 求 の 範 囲

1. 非メチル化 C p G 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする DNA。
- 5 2. 非メチル化 C p G 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質が、以下の(a)又は(b)のタンパク質であることを特徴とする請求項 1 記載の DNA。
 - (a)配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質
 - (b)配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ非メチル化 C p G 配列を有する細菌 DNA に対して反応性を有するタンパク質
- 10 3. 配列番号 1 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むことを特徴とする請求項 1 記載の DNA。
- 15 4. 請求項 3 記載の遺伝子を構成する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを特徴とする請求項 1 記載の DNA。
5. 非メチル化 C p G 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質が、以下の(a)又は(b)のタンパク質であることを特徴とする請求項 1 記載の DNA。
 - 20 (a)配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質
 - (b)配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ非メチル化 C p G 配列を有する細菌 DNA に対して反応性を有するタンパク質
- 25 6. 配列番号 3 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むことを特徴とする請求項 1 記載の DNA。

7. 請求項 6 記載の遺伝子を構成する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを特徴とする請求項 1 記載の DNA。
8. 非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質。
- 5 9. 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項 8 記載のタンパク質。
- 10 10. 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項 8 記載のタンパク質。
11. 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項 8 記載のタンパク質。
12. 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項 8 記載のタンパク質。
- 15 13. 請求項 8 ～ 12 のいずれか記載のタンパク質と、マーカートンパク質及び／又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質。
14. 請求項 8 ～ 12 のいずれか記載のタンパク質と特異的に結合する抗体。
15. 抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 14 記載の抗体。
- 20 16. 請求項 8 ～ 12 のいずれか記載のタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞。
17. 非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子が過剰発現することを特徴とする非
- 25 ヒト動物。
18. 非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受

容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする非ヒト動物。

19. 非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA に対して不反応性であることを特徴とする請求項 18 記載の非ヒト動物。

5 20. 齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項 17～19 のいずれか記載の非ヒト動物。

21. 非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した細胞に、請求項 1～7 のいずれか記載の DNA を導入することを特徴とする非メ

10 チル化 CpG 配列を有する細菌 DNA に対して反応性を有するタンパク質を発現する細胞の調製方法。

22. 請求項 21 記載の非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質を発現する細胞の調製方法により得られることを特徴とする非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異

15 的に認識する受容体タンパク質を発現する細胞。

23. 被検物質の存在下、非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質を発現している細胞をインビトロで培養し、TLR9 活性を測定・評価することを特徴とする非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質のア

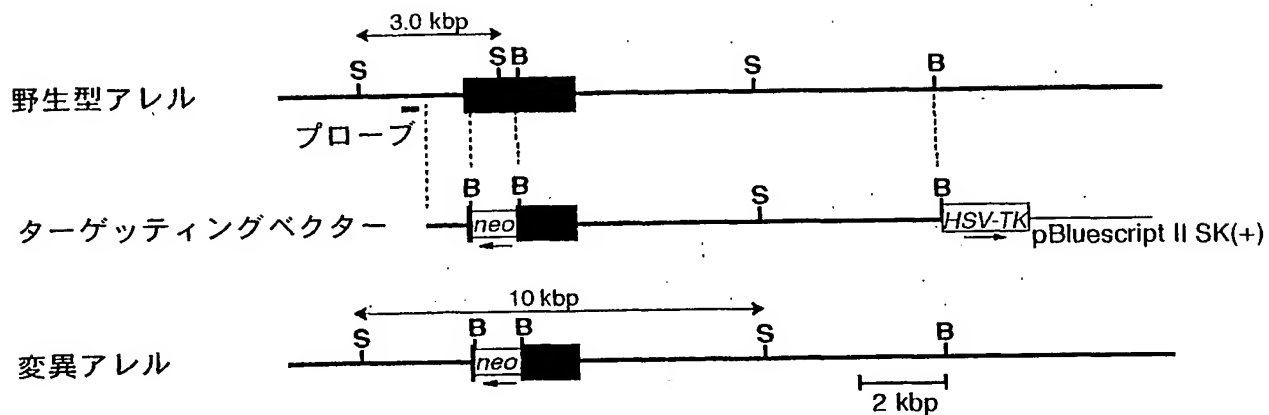
20 ゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法。

24. 非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞の TLR9 活性を測定・評価することを特徴とする非メチル化

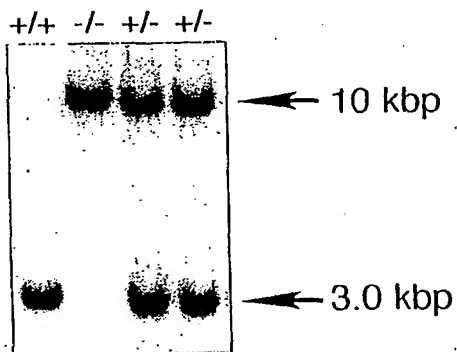
25 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法。

25. 非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子が過剰発現した非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞の TLR 9 活性を測定・評価することを特徴とする非メチル化 CpG 配列
- 5 有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法。
26. 非ヒト動物が、マウスであることを特徴とする請求項 24 又は 25 記載の非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA に対して反応性を有するタンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法。
- 10 27. 請求項 23～26 のいずれか記載の非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法により得られる非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニスト。
- 15 28. 非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質の全部又はその一部を有効成分として含有する医薬組成物。
29. 請求項 27 記載のアゴニスト又はアンタゴニストを有効成分として含有する医薬組成物。
- 20 30. 検体中の非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする DNA と、請求項 3 記載の DNA との塩基配列を比較することができる、請求項 3 記載の DNA を含むことを特徴とする非メチル化 CpG 配列を有する細菌 DNA を特異的に認識する受容体タンパク質をコードする DNA 配列の欠失、置換及び／又は付加に関連する疾病の診断キット。
- 25

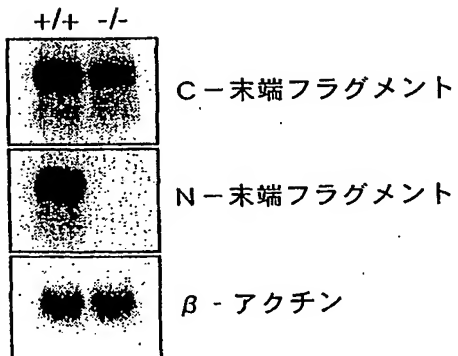
第 1 図



第 2 図



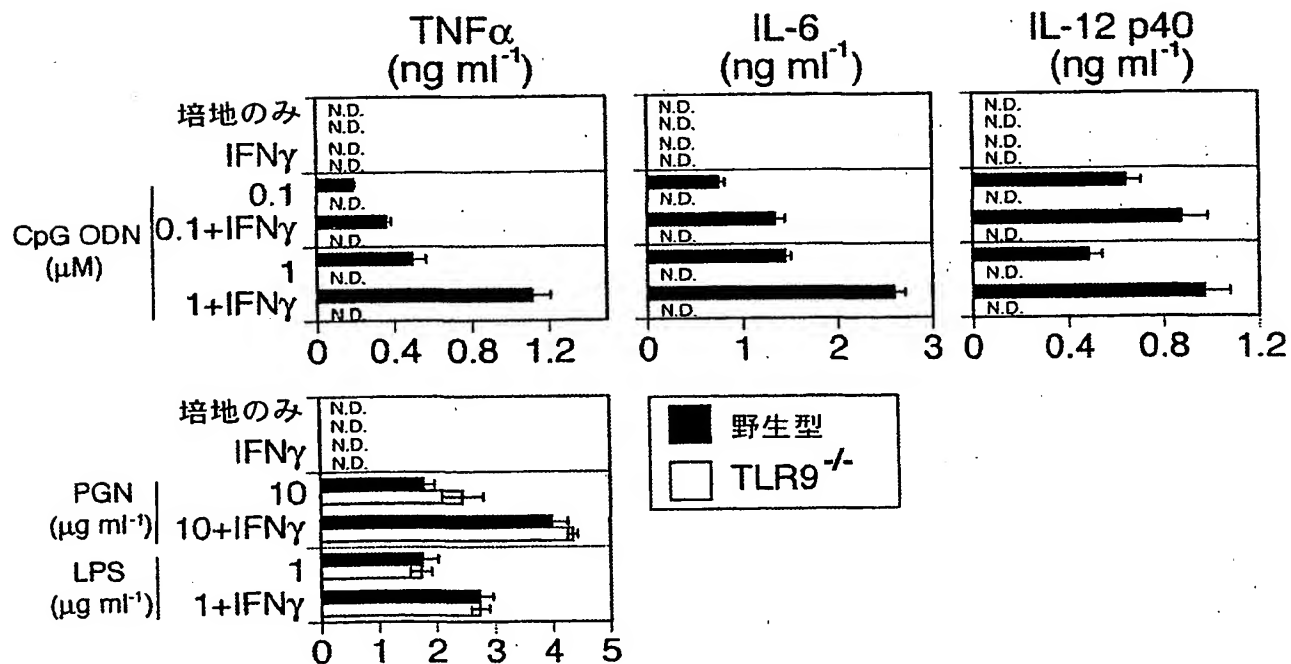
第 3 図



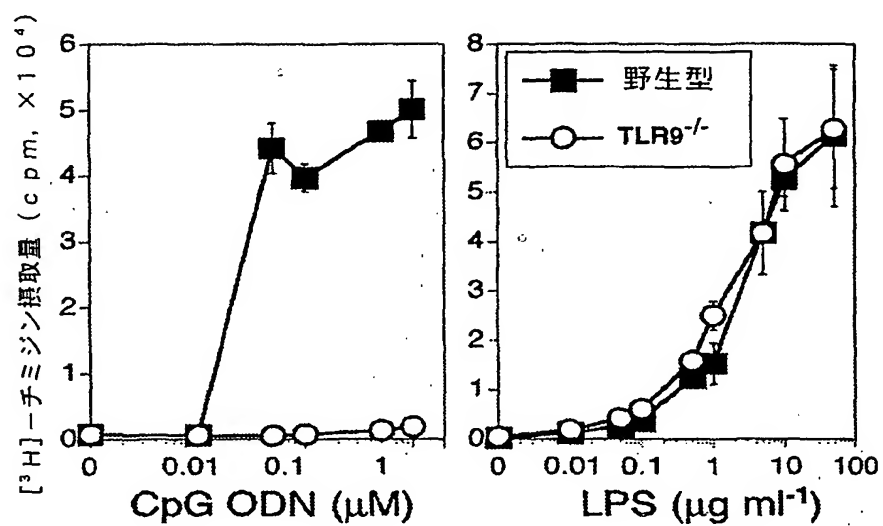
第 4 図

+/+	87	TCC	AAC	CTG	CGG	CAG	CTG	AAC	CTC	AAG	96	TGG	AAC	TGT	CCA	CCC	ACT	GGC	CTT	AGC	CCC	TTG	CAC	TTC	TCT	110	TGC
		S	N	L	R	Q	L	N	L	K	W	N	C	P	P	T	G	L	S	P	L	H	F	S	C		
-/-		S	N	L	R	Q	L	N	L	K	W	I	L	S	T	C	P	R	R	I	R	T	N	D	P		
	87	TCC	AAC	CTG	CGG	CAG	CTG	AAC	CTC	AAG	96	TGG	ATT	TTG	TCC	ACC	TGT	CCT	CGA	CGG	ATC	CGA	ACA	AAC	GAC	CCA	
+/+		CAC	ATG	ACC	ATT	GAG	CCC	AGA	ACC	TTC	120	CTG	GCT	ATG	CGT	ACA	CTG	GAG	GAG	CTG	AAC	CTG	AGC	TAT	AAT	GGT	
		H	M	T	I	E	P	R	T	F	L	A	M	R	T	L	E	E	L	N	L	S	Y	N	G		
-/-		T	P	V	R	F	I	L	S	F	Y	C	R	S	P	Q	K	N	S	S	R	R	R	*			
		ACA	CCC	GTG	CGT	TTT	ATT	CTG	TCT	TTT	TAT	TGC	CGA	TCC	CCT	CAG	AAG	AAC	TCG	TCA	AGA	AGG	CGA	TAG			

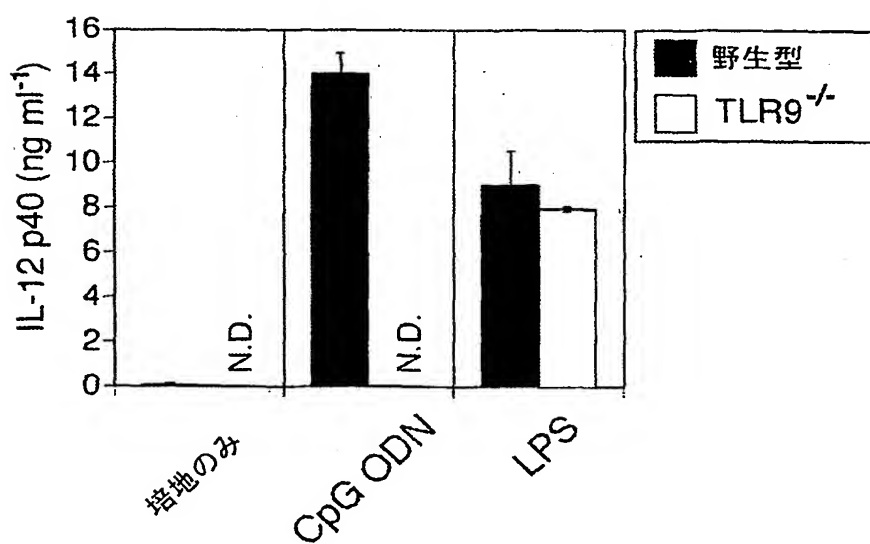
第 5 図



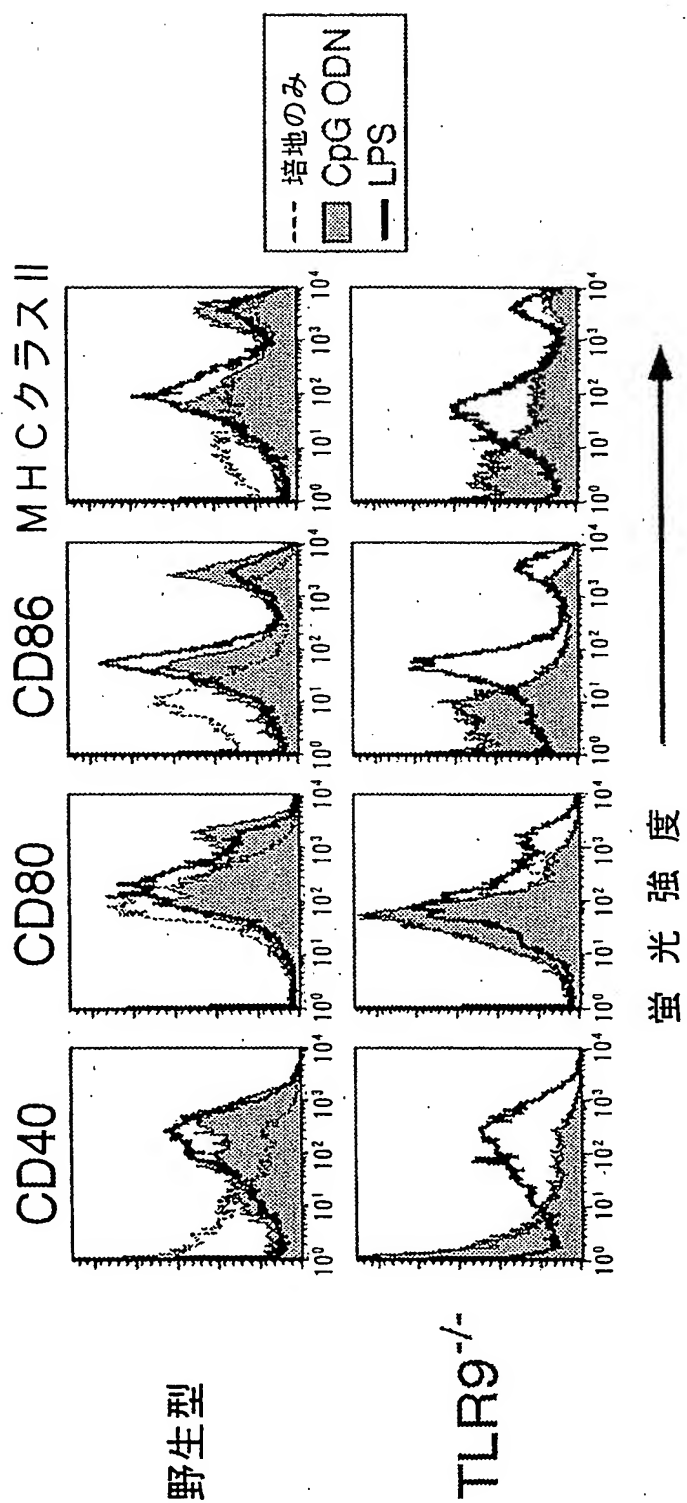
第 6 図



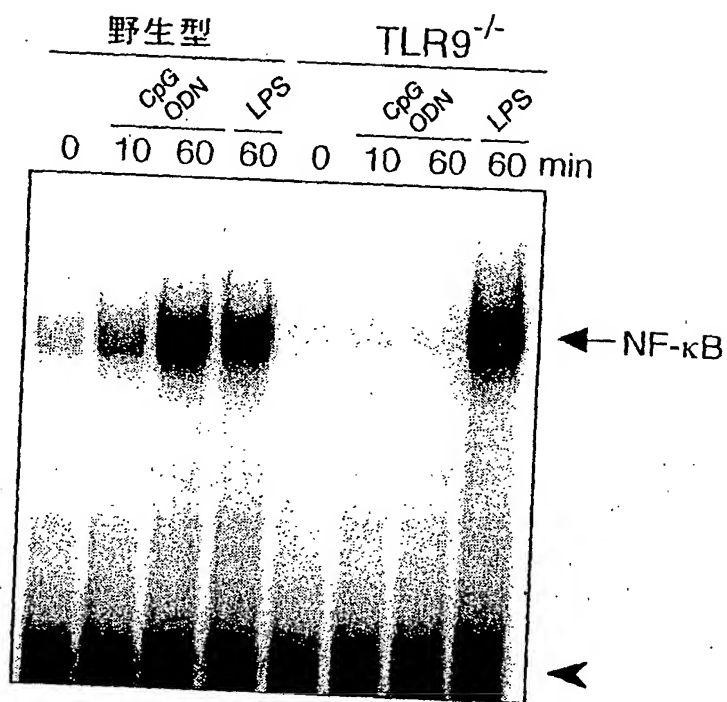
第 7 図



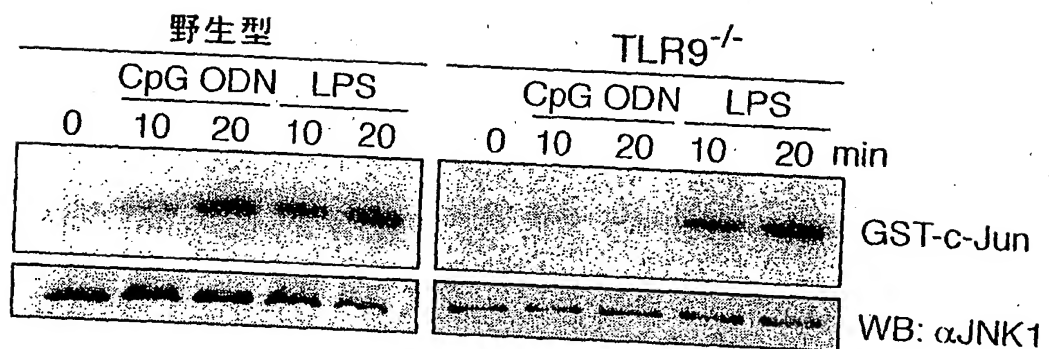
第 8 図



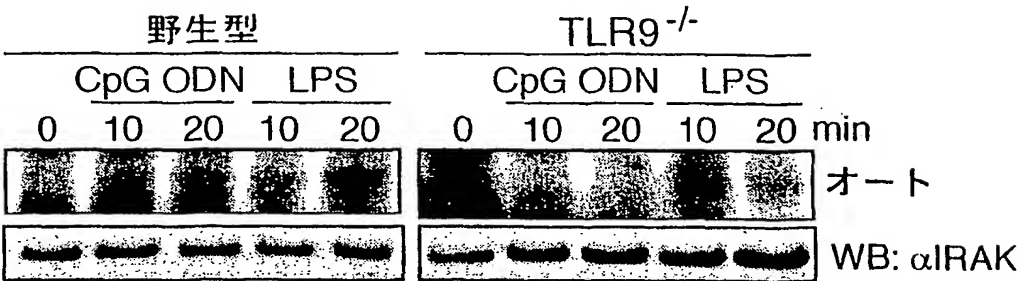
第 9 図



第 10 図



第 11 図



SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

<120> Specific receptor that recognizes bacterial DNA

<130> A031-29PCT

<140>

<141>

<150> 2000-219652

<151> 2000-07-19

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3257

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (107).. (3205)

<400> 1

ccgcigctgc ccctgiggga agggacctcg agtgtgaagc atccttccct gtagctgctg 60

tccagctctgc	ccgccagacc	cctctggagaa	gccccigccc	cccagc	atg	ggt	ttc	115
							Met Gly Phe	
						1		

tgc	cgc	agc	gcc	ctg	cac	ccg	ctg	tct	ctc	ctg	gig	cag	gcc	atc	atg	163
Cys	Arg	Ser	Ala	Leu	His	Pro	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Gln	Ala	Ile	Met	
	5				10					15						

ctg	gcc	atg	acc	ctg	gcc	ctg	ggt	acc	ttg	ccg	gcc	ttc	cta	ccc	tgt	211
Leu	Ala	Met	Thr	Leu	Ala	Leu	Gly	Thr	Leu	Pro	Ala	Phe	Leu	Pro	Cys	
	20				25				30					35		

gag	ctc	cag	ccc	cac	ggc	ctg	gtg	aac	tgc	aac	tgg	ctg	ttc	ctg	aag	259
Glu	Leu	Gln	Pro	His	Gly	Leu	Val	Asn	Cys	Asn	Trp	Leu	Phe	Leu	Lys	
			40					45						50		

tct gtg ccc cac ttc tcc atg gca gca ccc cgt ggc aat gtc acc agc	307
Ser Val Pro His Phe Ser Met Ala Ala Pro Arg Gly Asn Val Thr Ser	
55 60 65	
ctt tcc ttg tcc tcc aac cgc atc cac cac ctc cat gat tct gac ttt	355
Leu Ser Leu Ser Ser Asn Arg Ile His His Leu His Asp Ser Asp Phe	
70 75 80	
gcc cac ctg ccc agc ctg cgg cat ctc aac ctc aag tgg aac tgc ccg	403
Ala His Leu Pro Ser Leu Arg His Leu Asn Leu Lys Trp Asn Cys Pro	
85 90 95	
ccg gtt ggc ctc agc ccc atg cac ttc ccc tgc cac atg acc atc gag	451
Pro Val Gly Leu Ser Pro Met His Phe Pro Cys His Met Thr Ile Glu	
100 105 110 115	
ccc agc acc ttc ttg gct gtg ccc acc ctg gaa gag cta aac ctg agc	499
Pro Ser Thr Phe Leu Ala Val Pro Thr Leu Glu Glu Leu Asn Leu Ser	
120 125 130	
tac aac aac atc atg act gtg cct gcg ctg ccc aaa tcc ctc ata tcc	547
Tyr Asn Asn Ile Met Thr Val Pro Ala Leu Pro Lys Ser Leu Ile Ser	
135 140 145	
ctg tcc ctc agc cat acc aac atc ctg atg cta gac ict gcc agc ctc	595
Leu Ser Leu Ser His Thr Asn Ile Leu Met Leu Asp Ser Ala Ser Leu	
150 155 160	
gcc ggc ctg cat gcc ctg cgc ttc cta ttc atg gac ggc aac tgt tat	643
Ala Gly Leu His Ala Leu Arg Phe Leu Phe Met Asp Gly Asn Cys Tyr	
165 170 175	
tac aag aac ccc tgc agg cag gca ctg gag gtg gcc ccg ggt gcc ctc	691
Tyr Lys Asn Pro Cys Arg Gln Ala Leu Glu Val Ala Pro Gly Ala Leu	
180 185 190 195	
ctt ggc ctg ggc aac ctc acc cac ctg tca ctc aag tac aac aac ctc	739
Leu Gly Leu Gly Asn Leu Thr His Leu Ser Leu Lys Tyr Asn Asn Leu	
200 205 210	
act gtg gtg ccc cgc aac ctg cct tcc agc ctg gag tat ctg ctg ttg	787
Thr Val Val Pro Arg Asn Leu Pro Ser Ser Leu Glu Tyr Leu Leu Leu	
215 220 225	
tcc tac aac cgc atc gtc aaa cig gcg cct gag gac ctg gcc aat ctg	835
Ser Tyr Asn Arg Ile Val Lys Leu Ala Pro Glu Asp Leu Ala Asn Leu	

230	235	240	
acc gcc ctg cgt gtg ctc gat gtg ggc gga aat tgc cgc cgc tgc gac			883
Thr Ala Leu Arg Val Leu Asp Val Gly Gly Asn Cys Arg Arg Cys Asp			
245	250	255	
cac gct ccc aac ccc tgc atg gag tgc cct cgt cac ttc ccc cag cta			931
His Ala Pro Asn Pro Cys Met Glu Cys Pro Arg His Phe Pro Gln Leu			
260	265	270	275
cat ccc gat acc ttc agc cac ctg agc cgt cti gaa ggc ctg gtg ttg			979
His Pro Asp Thr Phe Ser His Leu Ser Arg Leu Glu Gly Leu Val Leu			
	280	285	290
aag gac agt tct ctc tcc tgg ctg aat gcc agt tgg ttc cgt ggg ctg			1027
Lys Asp Ser Ser Leu Ser Trp Leu Asn Ala Ser Trp Phe Arg Gly Leu			
	295	300	305
gga aac ctc cga gtg ctg gac ctg agt gag aac ttc ctc tac aaa tgc			1075
Gly Asn Leu Arg Val Leu Asp Leu Ser Glu Asn Phe Leu Tyr Lys Cys			
	310	315	320
atc act aaa acc aag gcc ttc cag ggc cta aca cag ctg cgc aag cti			1123
Ile Thr Lys Thr Lys Ala Phe Gln Gly Leu Thr Gln Leu Arg Lys Leu			
	325	330	335
aac ctg tcc ttc aat tac caa aag agg gtg tcc ttt gcc cac ctg tct			1171
Asn Leu Ser Phe Asn Tyr Gln Lys Arg Val Ser Phe Ala His Leu Ser			
340	345	350	355
ctg gcc cct tcc ttc ggg agc ctg gtc gcc ctg aag gag ctg gac atg			1219
Leu Ala Pro Ser Phe Gly Ser Leu Val Ala Leu Lys Glu Leu Asp Met			
	360	365	370
cac ggc atc ttc ttc cgc tca ctc gat gag acc acg ctc cgg cca ctg			1267
His Gly Ile Phe Phe Arg Ser Leu Asp Glu Thr Thr Leu Arg Pro Leu			
	375	380	385
gcc cgc ctg ccc atg ctc cag act ctg cgt ctg cag atg aac ttc atc			1315
Ala Arg Leu Pro Met Leu Gln Thr Leu Arg Leu Gln Met Asn Phe Ile			
	390	395	400
aac cag gcc cag ctc ggc atc ttc agg gcc ttc cct ggc ctg cgc tac			1363
Asn Gln Ala Gln Leu Gly Ile Phe Arg Ala Phe Pro Gly Leu Arg Tyr			
405	410	415	

gtg gac ctg tcg gac aac cgc atc agc gga gct tcg gag ctg aca gcc	1411
Val Asp Leu Ser Asp Asn Arg Ile Ser Gly Ala Ser Glu Leu Thr Ala	
420 425 430 435	
acc atg ggg gag gca gat gga ggg gag aag gtc tgg ctg cag cct ggg	1459
Thr Met Gly Glu Ala Asp Gly Gly Glu Lys Val Trp Leu Gln Pro Gly	
440 445 450	
gac ctt gct ccg gcc cca gtg gac act ccc agc tct gaa gac ttc agg	1507
Asp Leu Ala Pro Ala Pro Val Asp Thr Pro Ser Ser Glu Asp Phe Arg	
455 460 465	
ccc aac tgc agc acc ctc aac ttc acc ttg gat ctg tca cgg aac aac	1555
Pro Asn Cys Ser Thr Leu Asn Phe Thr Leu Asp Leu Ser Arg Asn Asn	
470 475 480	
ctg gtg acc gig cag ccg gag atg ttt gcc cag ctc tcg cac ctg cag	1603
Leu Val Thr Val Gln Pro Glu Met Phe Ala Gln Leu Ser His Leu Gln	
485 490 495	
tgc ctg cgc ctg agc cac aac tgc atc tcg cag gca gtc aat ggc tcc	1651
Cys Leu Arg Leu Ser His Asn Cys Ile Ser Gln Ala Val Asn Gly Ser	
500 505 510 515	
cag ttc ctg ccg ctg acc ggt ctg cag gtg cta gac ctg tcc cac aat	1699
Gln Phe Leu Pro Leu Thr Gly Leu Gln Val Leu Asp Leu Ser His Asn	
520 525 530	
aag ctg gac ctc tac cac gag cac tca ttc acg gag cta cca cga ctg	1747
Lys Leu Asp Leu Tyr His Glu His Ser Phe Thr Glu Leu Pro Arg Leu	
535 540 545	
gag gcc ctg gac ctc agc tac aac agc cag ccc ttt ggc atg cag ggc	1795
Glu Ala Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Ser Gln Pro Phe Gly Met Gln Gly	
550 555 560	
gtg ggc cac aac ttc agc ttc gtg gct cac ctg cgc acc ctg cgc cac	1843
Val Gly His Asn Phe Ser Phe Val Ala His Leu Arg Thr Leu Arg His	
565 570 575	
ctc agc ctg gcc cac aac aac atc cac agc caa gtg tcc cag cag ctc	1891
Leu Ser Leu Ala His Asn Asn Ile His Ser Gln Val Ser Gln Gln Leu	
580 585 590 595	
tgc agt acg tcg ctg cgg gcc ctg gac ttc agc ggc aat gca ctg ggc	1939
Cys Ser Thr Ser Leu Arg Ala Leu Asp Phe Ser Gly Asn Ala Leu Gly	

600	605	610	
cat atg tgg gcc gag gga gac ctc tat ctg cac ttc ttc caa ggc ctg			1987
His Met Trp Ala Glu Gly Asp Leu Tyr Leu His Phe Phe Gln Gly Leu			
615	620	625	
agc ggt ttg atc tgg ctg gac ttg tcc cag aac cgc ctg cac acc ctc			2035
Ser Gly Leu Ile Trp Leu Asp Leu Ser Gln Asn Arg Leu His Thr Leu			
630	635	640	
ctg ccc caa acc ctg cgc aac ctc ccc aag agc cta cag gtg ctg cgt			2083
Leu Pro Gln Thr Leu Arg Asn Leu Pro Lys Ser Leu Gln Val Leu Arg			
645	650	655	
ctc cgt gac aat tac ctg gcc ttc ttt aag tgg tgg agc ctc cac ttc			2131
Leu Arg Asp Asn Tyr Leu Ala Phe Phe Lys Trp Trp Ser Leu His Phe			
660	665	670	675
ctg ccc aaa ctg gaa gtc ctc gac ctg gca gga aac cag ctg aag gcc			2179
Leu Pro Lys Leu Glu Val Leu Asp Leu Ala Gly Asn Gln Leu Lys Ala			
680	685	690	
ctg acc aat ggc agc ctg cct gct ggc acc cgg ctc cgg agg ctg gat			2227
Leu Thr Asn Gly Ser Leu Pro Ala Gly Thr Arg Leu Arg Arg Leu Asp			
695	700	705	
gtc agc tgc aac agc atc agc ttc gtg gcc ccc ggc ttc ttt tcc aag			2275
Val Ser Cys Asn Ser Ile Ser Phe Val Ala Pro Gly Phe Phe Ser Lys			
710	715	720	
gcc aag gag ctg cga gag ctc aac ctt agc gcc aac gcc ctc aag aca			2323
Ala Lys Glu Leu Arg Glu Leu Asn Leu Ser Ala Asn Ala Leu Lys Thr			
725	730	735	
gtg gac cac tcc tgg ttt ggg ccc ctg gcg agt gcc ctg caa ata cta			2371
Val Asp His Ser Trp Phe Gly Pro Leu Ala Ser Ala Leu Gln Ile Leu			
740	745	750	755
gat gla agc gcc aac cct ctg cac tgc gcc tgi ggg gcg gcc ttt atg			2419
Asp Val Ser Ala Asn Pro Leu His Cys Ala Cys Gly Ala Ala Phe Met			
760	765	770	
gac ttc ctg ctg gag gtg cag gct gcc gtg ccc ggt ctg ccc agc cgg			2467
Asp Phe Leu Leu Glu Val Gln Ala Ala Val Pro Gly Leu Pro Ser Arg			
775	780	785	

gtg aag tgt ggc agt ccg ggc cag ctc cag ggc ctc agc atc ttt gca	2515
Val Lys Cys Gly Ser Pro Gly Gln Leu Gln Gly Leu Ser Ile Phe Ala	
790 795 800	
cag gac ctg cgc ctc tgc ctg gat gag gcc ctc tcc tgg gac tgt ttc	2563
Gln Asp Leu Arg Leu Cys Leu Asp Glu Ala Leu Ser Trp Asp Cys Phe	
805 810 815	
gcc ctc tgc ctg ctg gct gtg gct ctg ggc ctg ggt gtg ccc atg ctg	2611
Ala Leu Ser Leu Leu Ala Val Ala Leu Gly Leu Gly Val Pro Met Leu	
820 825 830 835	
cat cac ctc tgt ggc tgg gac ctc tgg tac tgc ttc cac ctg tgc ctg	2659
His His Leu Cys Gly Trp Asp Leu Trp Tyr Cys Phe His Leu Cys Leu	
840 845 850	
gcc tgg ctt ccc tgg cgg ggg cgg caa agt ggg cga gat gag gat gcc	2707
Ala Trp Leu Pro Trp Arg Gly Arg Gln Ser Gly Arg Asp Glu Asp Ala	
855 860 865	
ctg ccc tac gat gcc ttc gtg gtc ttc gac aaa acg cag agc gca gtg	2755
Leu Pro Tyr Asp Ala Phe Val Val Phe Asp Lys Thr Gln Ser Ala Val	
870 875 880	
gca gac tgg gtg tac aac gag ctt cgg ggg cag ctg gag gag tgc cgt	2803
Ala Asp Trp Val Tyr Asn Glu Leu Arg Gly Gln Leu Glu Glu Cys Arg	
885 890 895	
ggg cgc tgg gca ctc cgc ctg tgc ctg gag gaa cgc gac tgg ctg cct	2851
Gly Arg Trp Ala Leu Arg Leu Cys Leu Glu Glu Arg Asp Trp Leu Pro	
900 905 910 915	
ggc aaa acc ctc ttt gag aac ctg tgg gcc tgc gtc tat ggc agc cgc	2899
Gly Lys Thr Leu Phe Glu Asn Leu Trp Ala Ser Val Tyr Gly Ser Arg	
920 925 930	
aag acg ctg ttt gtg ctg gcc cac acg gac cgg gtc agt ggt ctc ttg	2947
Lys Thr Leu Phe Val Leu Ala His Thr Asp Arg Val Ser Gly Leu Leu	
935 940 945	
cgc gcc agc ttc ctg ctg gcc cag cag cgc ctg ctg gag gac cgc aag	2995
Arg Ala Ser Phe Leu Leu Ala Gln Gln Arg Leu Leu Glu Asp Arg Lys	
950 955 960	
gac gtc gtg gtg ctg gtg atc ctg agc cct gac ggc cgc cgc tcc cgc	3043
Asp Val Val Val Leu Val Ile Leu Ser Pro Asp Gly Arg Arg Ser Arg	

965	970	975	
iac gig cgg ctg cgc cag cgc ctc tgc cgc cag agt gtc ctc ctc tgg			3091
Tyr Val Arg Leu Arg Gln Arg Leu Cys Arg Gln Ser Val Leu Leu Trp			
980	985	990	995
ccc cac cag ccc agt ggt cag cgc agc ttc tgg gcc cag ctg ggc atg			3139
Pro His Gln Pro Ser Gly Gln Arg Ser Phe Trp Ala Gln Leu Gly Met			
1000	1005	1010	
gcc ctg acc agg gac aac cac cac ttc tat aac cgg aac ttc tgc cag			3187
Ala Leu Thr Arg Asp Asn His His Phe Tyr Asn Arg Asn Phe Cys Gln			
1015	1020	1025	
gga ccc acg gcc gaa tag ccgtgagccg gaalccctgca cgggtgccacc			3235
Gly Pro Thr Ala Glu			
1030			
tccacactca cctcacctct gc			3257

<210> 2
 <211> 1032
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Gly Phe Cys Arg Ser Ala Leu His Pro Leu Ser Leu Leu Val Gln
 1 5 10 15
 Ala Ile Met Leu Ala Met Thr Leu Ala Leu Gly Thr Leu Pro Ala Phe
 20 25 30
 Leu Pro Cys Glu Leu Gln Pro His Gly Leu Val Asn Cys Asn Trp Leu
 35 40 45
 Phe Leu Lys Ser Val Pro His Phe Ser Met Ala Ala Pro Arg Gly Asn
 50 55 60
 Val Thr Ser Leu Ser Leu Ser Ser Asn Arg Ile His His Leu His Asp
 65 70 75 80
 Ser Asp Phe Ala His Leu Pro Ser Leu Arg His Leu Asn Leu Lys Trp
 85 90 95
 Asn Cys Pro Pro Val Gly Leu Ser Pro Met His Phe Pro Cys His Met
 100 105 110
 Thr Ile Glu Pro Ser Thr Phe Leu Ala Val Pro Thr Leu Glu Glu Leu
 115 120 125
 Asn Leu Ser Tyr Asn Asn Ile Met Thr Val Pro Ala Leu Pro Lys Ser
 130 135 140
 Leu Ile Ser Leu Ser Leu Ser His Thr Asn Ile Leu Met Leu Asp Ser

145		150		155		160
Ala Ser Leu Ala Gly Leu His Ala Leu Arg Phe Leu Phe Met Asp Gly						
	165		170		175	
Asn Cys Tyr Tyr Lys Asn Pro Cys Arg Gln Ala Leu Glu Val Ala Pro						
	180		185		190	
Gly Ala Leu Leu Gly Leu Gly Asn Leu Thr His Leu Ser Leu Lys Tyr						
	195		200		205	
Asn Asn Leu Thr Val Val Pro Arg Asn Leu Pro Ser Ser Leu Glu Tyr						
	210		215		220	
Leu Leu Leu Ser Tyr Asn Arg Ile Val Lys Leu Ala Pro Glu Asp Leu						
225		230		235		240
Ala Asn Leu Thr Ala Leu Arg Val Leu Asp Val Gly Gly Asn Cys Arg						
	245		250		255	
Arg Cys Asp His Ala Pro Asn Pro Cys Met Glu Cys Pro Arg His Phe						
	260		265		270	
Pro Gln Leu His Pro Asp Thr Phe Ser His Leu Ser Arg Leu Glu Gly						
	275		280		285	
Leu Val Leu Lys Asp Ser Ser Leu Ser Trp Leu Asn Ala Ser Trp Phe						
	290		295		300	
Arg Gly Leu Gly Asn Leu Arg Val Leu Asp Leu Ser Glu Asn Phe Leu						
305		310		315		320
Tyr Lys Cys Ile Thr Lys Thr Lys Ala Phe Gln Gly Leu Thr Gln Leu						
	325		330		335	
Arg Lys Leu Asn Leu Ser Phe Asn Tyr Gln Lys Arg Val Ser Phe Ala						
	340		345		350	
His Leu Ser Leu Ala Pro Ser Phe Gly Ser Leu Val Ala Leu Lys Glu						
	355		360		365	
Leu Asp Met His Gly Ile Phe Phe Arg Ser Leu Asp Glu Thr Thr Leu						
	370		375		380	
Arg Pro Leu Ala Arg Leu Pro Met Leu Gln Thr Leu Arg Leu Gln Met						
385		390		395		400
Asn Phe Ile Asn Gln Ala Gln Leu Gly Ile Phe Arg Ala Phe Pro Gly						
	405		410		415	
Leu Arg Tyr Val Asp Leu Ser Asp Asn Arg Ile Ser Gly Ala Ser Glu						
	420		425		430	
Leu Thr Ala Thr Met Gly Glu Ala Asp Gly Gly Glu Lys Val Trp Leu						
	435		440		445	
Gln Pro Gly Asp Leu Ala Pro Ala Pro Val Asp Thr Pro Ser Ser Glu						
	450		455		460	
Asp Phe Arg Pro Asn Cys Ser Thr Leu Asn Phe Thr Leu Asp Leu Ser						
465		470		475		480
Arg Asn Asn Leu Val Thr Val Gln Pro Glu Met Phe Ala Gln Leu Ser						
	485		490		495	
His Leu Gln Cys Leu Arg Leu Ser His Asn Cys Ile Ser Gln Ala Val						
	500		505		510	
Asn Gly Ser Gln Phe Leu Pro Leu Thr Gly Leu Gln Val Leu Asp Leu						

515	520	525
Ser His Asn Lys Leu Asp	Leu Tyr His Glu His	Ser Phe Thr Glu Leu
530	535	540
Pro Arg Leu Glu Ala Leu Asp	Leu Ser Tyr Asn Ser	Gln Pro Phe Gly
545	550	555
Met Gln Gly Val Gly His Asn Phe	Ser Phe Val Ala His	Leu Arg Thr
565	570	575
Leu Arg His Leu Ser Leu Ala His	Asn Asn Ile His Ser	Gln Val Ser
580	585	590
Gln Gln Leu Cys Ser Thr Ser Leu	Arg Ala Leu Asp Phe Ser	Gly Asn
595	600	605
Ala Leu Gly His Met Trp Ala Glu	Gly Asp Leu Tyr Leu His	Phe Phe
610	615	620
Gln Gly Leu Ser Gly Leu Ile Trp	Leu Asp Leu Ser Gln Asn	Arg Leu
625	630	635
His Thr Leu Leu Pro Gln Thr Leu	Arg Asn Leu Pro Lys Ser	Leu Gln
645	650	655
Val Leu Arg Leu Arg Asp Asn Tyr	Leu Ala Phe Phe Lys Trp	Trp Ser
660	665	670
Leu His Phe Leu Pro Lys Leu Glu	Val Leu Asp Leu Ala Gly	Asn Gln
675	680	685
Leu Lys Ala Leu Thr Asn Gly Ser	Leu Pro Ala Gly Thr Arg	Leu Arg
690	695	700
Arg Leu Asp Val Ser Cys Asn Ser	Ile Ser Phe Val Ala Pro	Gly Phe
705	710	715
Phe Ser Lys Ala Lys Glu Leu Arg	Glu Leu Asn Leu Ser Ala	Asn Ala
725	730	735
Leu Lys Thr Val Asp His Ser Trp	Phe Gly Pro Leu Ala Ser	Ala Leu
740	745	750
Gln Ile Leu Asp Val Ser Ala Asn	Pro Leu His Cys Ala Cys	Gly Ala
755	760	765
Ala Phe Met Asp Phe Leu Leu Glu	Val Gln Ala Ala Val Pro	Gly Leu
770	775	780
Pro Ser Arg Val Lys Cys Gly Ser	Pro Gly Gln Leu Gln Gly	Leu Ser
785	790	795
Ile Phe Ala Gln Asp Leu Arg Leu	Cys Leu Asp Glu Ala Leu	Ser Trp
805	810	815
Asp Cys Phe Ala Leu Ser Leu Leu	Ala Val Ala Leu Gly Leu	Gly Val
820	825	830
Pro Met Leu His His Leu Cys Gly	Trp Asp Leu Trp Tyr Cys	Phe His
835	840	845
Leu Cys Leu Ala Trp Leu Pro Trp	Arg Gly Arg Gln Ser Gly	Arg Asp
850	855	860
Glu Asp Ala Leu Pro Tyr Asp Ala	Phe Val Val Phe Asp Lys	Thr Gln
865	870	875
Ser Ala Val Ala Asp Trp Val Tyr	Asn Glu Leu Arg Gly Gln	Leu Glu

885 890 895
 Glu Cys Arg Gly Arg Trp Ala Leu Arg Leu Cys Leu Glu Glu Arg Asp
 900 905 910
 Trp Leu Pro Gly Lys Thr Leu Phe Glu Asn Leu Trp Ala Ser Val Tyr
 915 920 925
 Gly Ser Arg Lys Thr Leu Phe Val Leu Ala His Thr Asp Arg Val Ser
 930 935 940
 Gly Leu Leu Arg Ala Ser Phe Leu Leu Ala Gln Gln Arg Leu Leu Glu
 945 950 955 960
 Asp Arg Lys Asp Val Val Val Leu Val Ile Leu Ser Pro Asp Gly Arg
 965 970 975
 Arg Ser Arg Tyr Val Arg Leu Arg Gln Arg Leu Cys Arg Gln Ser Val
 980 985 990
 Leu Leu Trp Pro His Gln Pro Ser Gly Gln Arg Ser Phe Trp Ala Gln
 995 1000 1005
 Leu Gly Met Ala Leu Thr Arg Asp Asn His His Phe Tyr Asn Arg Asn
 1010 1015 1020
 Phe Cys Gln Gly Pro Thr Ala Glu
 1025 1030

<210> 3

<211> 3471

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220> .

<221> CDS

<222> (107)..(3205)

<400> 3

tgaaagigtc acttccicaa ttctctgaga gacctggig tggaacatca ttctctgccg 60

cccagtttgt cagaggagc ctctggagaa tcttccatct cccaac atg gti ctc 115

Met Val Leu

1

cgt cga agg act ctg cac ccc ttg tcc ctc ctg gta cag gct gca gtg 163

Arg Arg Arg Thr Leu His Pro Leu Ser Leu Leu Val Gln Ala Ala Val

5

10

15

ctg gct gag act ctg gcc ctg ggt acc ctg cct gcc ttc cta ccc tgt 211

Leu Ala Glu Thr Leu Ala Leu Gly Thr Leu Pro Ala Phe Leu Pro Cys

20

25

30

35

gag ctg aag cct cat ggc ctg gtg gac tgc aat tgg ctg ttc ctg aag	259
Glu Leu Lys Pro His Gly Leu Val Asp Cys Asn Trp Leu Phe Leu Lys	
40 45 50	
tct gta ccc cgt ttc tct gcg gca gca tcc tgc tcc aac atc acc cgc	307
Ser Val Pro Arg Phe Ser Ala Ala Ala Ser Cys Ser Asn Ile Thr Arg	
55 60 65	
ctc tcc ttg atc tcc aac cgt atc cac cac ctg cac aac tcc gac ttc	355
Leu Ser Leu Ile Ser Asn Arg Ile His His Leu His Asn Ser Asp Phe	
70 75 80	
gtc cac ctg tcc aac ctg cgg cag ctg aac ctc aag tgg aac tgt cca	403
Val His Leu Ser Asn Leu Arg Gln Leu Asn Leu Lys Trp Asn Cys Pro	
85 90 95	
ccc act ggc ctt agc ccc ttg cac ttc tct tgc cac atg acc att gag	451
Pro Thr Gly Leu Ser Pro Leu His Phe Ser Cys His Met Thr Ile Glu	
100 105 110 115	
ccc aga acc ttc ctg gct atg cgt aca ctg gag gag ctg aac ctg agc	499
Pro Arg Thr Phe Leu Ala Met Arg Thr Leu Glu Glu Leu Asn Leu Ser	
120 125 130	
tat aat ggt atc acc act gtg ccc cga ctg ccc agc tcc ctg gtg aat	547
Tyr Asn Gly Ile Thr Thr Val Pro Arg Leu Pro Ser Ser Leu Val Asn	
135 140 145	
ctg agc ctg agc cac acc aac atc ctg gtt cta gat gct aac agc ctc	595
Leu Ser Leu Ser His Thr Asn Ile Leu Val Leu Asp Ala Asn Ser Leu	
150 155 160	
gcc ggc cta tac agc ctg cgc gtt ctc ttc atg gac ggg aac tgc tac	643
Ala Gly Leu Tyr Ser Leu Arg Val Leu Phe Met Asp Gly Asn Cys Tyr	
165 170 175	
tac aag aac ccc tgc aca gga gcg gtg aag gtg acc cca ggc gcc ctc	691
Tyr Lys Asn Pro Cys Thr Gly Ala Val Lys Val Thr Pro Gly Ala Leu	
180 185 190 195	
ctg ggc ctg agc aat ctc acc cat ctg tct gtg aag tat aac aac ctc	739
Leu Gly Leu Ser Asn Leu Thr His Leu Ser Val Lys Tyr Asn Asn Leu	
200 205 210	
aca aag gtg ccc cgc caa ctg ccc ccc agc ctg gag tac ctc ctg gtg	787
Thr Lys Val Pro Arg Gln Leu Pro Pro Ser Leu Glu Tyr Leu Leu Val	

215	220	225	
tcc tat aac ctc att gtc aag ctg ggg cct gaa gac ctg gcc aat ctg			835
Ser Tyr Asn Leu Ile Val Lys Leu Gly Pro Glu Asp Leu Ala Asn Leu			
230	235	240	
acc tcc ctt cga gta ctt gat gtg ggt ggg aat tgc cgt cgc tgc gac			883
Thr Ser Leu Arg Val Leu Asp Val Gly Gly Asn Cys Arg Arg Cys Asp			
245	250	255	
cat gcc ccc aat ccc tgt ata gaa tgt ggc caa aag tcc ctc cac ctg			931
His Ala Pro Asn Pro Cys Ile Glu Cys Gly Gln Lys Ser Leu His Leu			
260	265	270	275
cac cct gag acc ttc cat cac ctg agc cat ctg gaa ggc ctg gtg ctg			979
His Pro Glu Thr Phe His His Leu Ser His Leu Glu Gly Leu Val Leu			
280	285	290	
aag gac agc tct ctc cat aca ctg aac tct tcc tgg ttc caa ggt ctg			1027
Lys Asp Ser Ser Leu His Thr Leu Asn Ser Ser Trp Phe Gln Gly Leu			
295	300	305	
gtc aac ctc tgc gtg ctg gac cta agc gag aac ttt ctc tat gaa agc			1075
Val Asn Leu Ser Val Leu Asp Leu Ser Glu Asn Phe Leu Tyr Glu Ser			
310	315	320	
atc aac cac acc aat gcc ttt cag aac cta acc cgc ctg cgc aag ctc			1123
Ile Asn His Thr Asn Ala Phe Gln Asn Leu Thr Arg Leu Arg Lys Leu			
325	330	335	
aac ctg tcc ttc aat tac cgc aag aag gta tcc ttt gcc cgc ctc cac			1171
Asn Leu Ser Phe Asn Tyr Arg Lys Lys Val Ser Phe Ala Arg Leu His			
340	345	350	355
ctg gca agt tcc ttc aag aac ctg gtg tca ctg cag gag ctg aac atg			1219
Leu Ala Ser Ser Phe Lys Asn Leu Val Ser Leu Gln Glu Leu Asn Met			
360	365	370	
aac ggc atc ttc ttc cgc tgc ctc aac aag tac acg ctc aga tgg ctg			1267
Asn Gly Ile Phe Phe Arg Ser Leu Asn Lys Tyr Thr Leu Arg Trp Leu			
375	380	385	
gcc gat ctg ccc aaa ctc cac act ctg cat ctt caa atg aac ttc atc			1315
Ala Asp Leu Pro Lys Leu His Thr Leu His Leu Gln Met Asn Phe Ile			
390	395	400	

aac cag gca cag ctc agc atc ttt ggt acc ttc cga gcc ctt cgc ttt 1363
 Asn Gln Ala Gln Leu Ser Ile Phe Gly Thr Phe Arg Ala Leu Arg Phe
 405 410 415

gtg gac ttg tca gac aat cgc atc agt ggg cct tca acg ctg tca gaa 1411
 Val Asp Leu Ser Asp Asn Arg Ile Ser Gly Pro Ser Thr Leu Ser Glu
 420 425 430 435

gcc acc cct gaa gag gca gat gat gca gag cag gag gag ctg ttg tct 1459
 Ala Thr Pro Glu Glu Ala Asp Asp Ala Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ser
 440 445 450

gcg gat cct cac cca gct cca ctg agc acc cct gct tct aag aac ttc 1507
 Ala Asp Pro His Pro Ala Pro Leu Ser Thr Pro Ala Ser Lys Asn Phe
 455 460 465

atg gac agg lgt aag aac ttc aag ttc acc atg gac ctg tct cgg aac 1555
 Met Asp Arg Cys Lys Asn Phe Lys Phe Thr Met Asp Leu Ser Arg Asn
 470 475 480

aac ctg gtg act atc aag cca gag atg ttt gtc aat ctc tca cgc ctc 1603
 Asn Leu Val Thr Ile Lys Pro Glu Met Phe Val Asn Leu Ser Arg Leu
 485 490 495

cag tgt ctt agc ctg agc cac aac tcc att gca cag gct gtc aat ggc 1651
 Gln Cys Leu Ser Leu Ser His Asn Ser Ile Ala Gln Ala Val Asn Gly
 500 505 510 515

tct cag ttc ctg ccg ctg act aat ctg cag gtg ctg gac ctg tcc cat 1699
 Ser Gln Phe Leu Pro Leu Thr Asn Leu Gln Val Leu Asp Leu Ser His
 520 525 530

aac aaa ctg gac ttg tac cac tgg aaa tcg ttc agt gag cta cca cag 1747
 Asn Lys Leu Asp Leu Tyr His Trp Lys Ser Phe Ser Glu Leu Pro Gln
 535 540 545

ttg cag gcc ctg gac ctg agc tac aac agc cag ccc ttt agc atg aag 1795
 Leu Gln Ala Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Ser Gln Pro Phe Ser Met Lys
 550 555 560

ggt ata ggc cac aat ttc agt ttt gtg gcc cat ctg tcc atg cta cac 1843
 Gly Ile Gly His Asn Phe Ser Phe Val Ala His Leu Ser Met Leu His
 565 570 575

agc ctt agc ctg gca cac aat gac att cat acc cgt gtg tcc tca cat 1891
 Ser Leu Ser Leu Ala His Asn Asp Ile His Thr Arg Val Ser Ser His

580	585	590	595	
ctc aac agc aac tca gtg agg ttt ctt gac ttc agc ggc aac ggt aig				1939
Leu Asn Ser Asn Ser Val Arg Phe Leu Asp Phe Ser Gly Asn Gly Met				
	600	605	610	
ggc cgc atg tgg gat gag ggg ggc ctt tat ctc cat ttc ttc caa ggc				1987
Gly Arg Met Trp Asp Glu Gly Gly Leu Tyr Leu His Phe Phe Gln Gly				
	615	620	625	
ctg agt ggc ctg ctg aag ctg gac ctg tct caa aat aac ctg cat atc				2035
Leu Ser Gly Leu Leu Lys Leu Asp Leu Ser Gln Asn Asn Leu His Ile				
	630	635	640	
ctc cgg ccc cag aac ctt gac aac ctc ccc aag agc ctg aag ctg ctg				2083
Leu Arg Pro Gln Asn Leu Asp Asn Leu Pro Lys Ser Leu Lys Leu Leu				
	645	650	655	
agc ctc cga gac aac tac cta tct ttc ttt aac tgg acc agt ctg tcc				2131
Ser Leu Arg Asp Asn Tyr Leu Ser Phe Phe Asn Trp Thr Ser Leu Ser				
	660	665	670	675
ttc ctg ccc aac ctg gaa gtc cta gac ctg gca ggc aac cag cta aag				2179
Phe Leu Pro Asn Leu Glu Val Leu Asp Leu Ala Gly Asn Gln Leu Lys				
	680	685	690	
gcc ctg acc aat ggc acc ctg cct aat ggc acc ctc ctc cag aaa ctg				2227
Ala Leu Thr Asn Gly Thr Leu Pro Asn Gly Thr Leu Leu Gln Lys Leu				
	695	700	705	
gat gtc agc agc aac agt atc gtc tct gtg gtc cca gcc ttc ttc gct				2275
Asp Val Ser Ser Asn Ser Ile Val Ser Val Val Pro Ala Phe Phe Ala				
	710	715	720	
ctg gcg gtc gag ctg aaa gag gtc aac ctc agc cac aac att ctc aag				2323
Leu Ala Val Glu Leu Lys Glu Val Asn Leu Ser His Asn Ile Leu Lys				
	725	730	735	
acg gtg gat cgc tcc tgg ttt ggg ccc att gtg atg aac ctg aca gtt				2371
Thr Val Asp Arg Ser Trp Phe Gly Pro Ile Val Met Asn Leu Thr Val				
	740	745	750	755
cta gac gtg aga agc aac cct ctg cac tgt gcc tgt ggg gca gcc ttc				2419
Leu Asp Val Arg Ser Asn Pro Leu His Cys Ala Cys Gly Ala Ala Phe				
	760	765	770	

gla gac tta ctg ttg gag gtg cag acc aag gtg cct ggc ctg gct aat	2467
Val Asp Leu Leu Leu Glu Val Gln Thr Lys Val Pro Gly Leu Ala Asn	
775 780 785	
ggi gtg aag tgt ggc agc ccc ggc cag ctg cag ggc cgt agc atc ttc	2515
Gly Val Lys Cys Gly Ser Pro Gly Gln Leu Gln Gly Arg Ser Ile Phe	
790 795 800	
gca cag gac ctg cgg ctg tgc ctg gat gag gtc ctc tct tgg gac tgc	2563
Ala Gln Asp Leu Arg Leu Cys Leu Asp Glu Val Leu Ser Trp Asp Cys	
805 810 815	
ttt ggc ctt tca ctc ttg gct gtg gcc gtg ggc atg gtg gtg cct ata	2611
Phe Gly Leu Ser Leu Leu Ala Val Ala Val Gly Met Val Val Pro Ile	
820 825 830 835	
ctg cac cat ctc tgc ggc tgg gac gtc tgg tac tgt ttt cat ctg tgc	2659
Leu His His Leu Cys Gly Trp Asp Val Trp Tyr Cys Phe His Leu Cys	
840 845 850	
ctg gca tgg cta cct ttg ctg gcc cgc agc cga cgc agc gcc caa gct	2707
Leu Ala Trp Leu Pro Leu Leu Ala Arg Ser Arg Arg Ser Ala Gln Ala	
855 860 865	
ctc ccc tat gat gcc ttc gtg gtg ttc gat aag gca cag agc gca gtt	2755
Leu Pro Tyr Asp Ala Phe Val Val Phe Asp Lys Ala Gln Ser Ala Val	
870 875 880	
gcg gac tgg gtg tat aac gag ctg cgg gtg cgg ctg gag gag cgg cgc	2803
Ala Asp Trp Val Tyr Asn Glu Leu Arg Val Arg Leu Glu Glu Arg Arg	
885 890 895	
ggi cgc cga gcc cta cgc ttg tgt ctg gag gac cga gat tgg ctg cct	2851
Gly Arg Arg Ala Leu Arg Leu Cys Leu Glu Asp Arg Asp Trp Leu Pro	
900 905 910 915	
ggc cag acg ctc ttc gag aac ctc tgg gct tcc atc tat ggg agc cgc	2899
Gly Gln Thr Leu Phe Glu Asn Leu Trp Ala Ser Ile Tyr Gly Ser Arg	
920 925 930	
aag act cta ttt gtg ctg gcc cac acg gac cgc gtc agt ggc ctc ctg	2947
Lys Thr Leu Phe Val Leu Ala His Thr Asp Arg Val Ser Gly Leu Leu	
935 940 945	
cgc acc agc ttc ctg ctg gct cag cag cgc ctg ttg gaa gac cgc aag	2995
Arg Thr Ser Phe Leu Leu Ala Gln Gln Arg Leu Leu Glu Asp Arg Lys	

950	955	960	
gac gtg gtg gtg ttg gtg atc ctg cgt ccg gat gcc cac cgc tcc cgc			3043
Asp Val Val Val Leu Val Ile Leu Arg Pro Asp Ala His Arg Ser Arg			
965	970	975	
tat gtg cga ctg cgc cag cgt ctc tgc cgc cag agt gtg ctc ttc tgg			3091
Tyr Val Arg Leu Arg Gln Arg Leu Cys Arg Gln Ser Val Leu Phe Trp			
980	985	990	995
ccc cag cag ccc aac ggg cag ggg ggc ttc tgg gcc cag ctg agt aca			3139
Pro Gln Gln Pro Asn Gly Gln Gly Gly Phe Trp Ala Gln Leu Ser Thr			
1000	1005	1010	
gcc ctg act agg gac aac cgc cac ttc tat aac cag aac ttc tgc cgg			3187
Ala Leu Thr Arg Asp Asn Arg His Phe Tyr Asn Gln Asn Phe Cys Arg			
1015	1020	1025	
gga cct aca gca gaa tag ctgagagcaa cagctggaaa cagctgcatc			3235
Gly Pro Thr Ala Glu			
1030			
ttcatgccctg gtccccgagt tgcctgcct gccctgctct gtcttactac accgctatit			3295
ggcaagtgcg caatataigc taccaagcca ccaggccac ggagcaaagg tggcagtaa			3355
agggtagttt tcttccaig catctttcag gagagtgaag atagacacca gaccacaca			3415
gaacaggact ggagttcatl ctctgcccci ccacccact ttgcctgtct cigtat			3471

<210> 4

<211> 1032

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met	Val	Leu	Arg	Arg	Arg	Thr	Leu	His	Pro	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Gln
1				5					10					15	
Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Glu	Thr	Leu	Ala	Leu	Gly	Thr	Leu	Pro	Ala	Phe
		20						25					30		
Leu	Pro	Cys	Glu	Leu	Lys	Pro	His	Gly	Leu	Val	Asp	Cys	Asn	Trp	Leu
		35				40					45				
Phe	Leu	Lys	Ser	Val	Pro	Arg	Phe	Ser	Ala	Ala	Ala	Ser	Cys	Ser	Asn
	50					55				60					
Ile	Thr	Arg	Leu	Ser	Leu	Ile	Ser	Asn	Arg	Ile	His	His	Leu	His	Asn

65					70					75				80	
Ser	Asp	Phe	Val	His	Leu	Ser	Asn	Leu	Arg	Gln	Leu	Asn	Leu	Lys	Trp
				85					90					95	
Asn	Cys	Pro	Pro	Thr	Gly	Leu	Ser	Pro	Leu	His	Phe	Ser	Cys	His	Met
		100						105					110		
Thr	Ile	Glu	Pro	Arg	Thr	Phe	Leu	Ala	Met	Arg	Thr	Leu	Glu	Glu	Leu
		115					120					125			
Asn	Leu	Ser	Tyr	Asn	Gly	Ile	Thr	Thr	Val	Pro	Arg	Leu	Pro	Ser	Ser
		130				135					140				
Leu	Val	Asn	Leu	Ser	Leu	Ser	His	Thr	Asn	Ile	Leu	Val	Leu	Asp	Ala
145					150				155					160	
Asn	Ser	Leu	Ala	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Arg	Val	Leu	Phe	Met	Asp	Gly
				165					170					175	
Asn	Cys	Tyr	Tyr	Lys	Asn	Pro	Cys	Thr	Gly	Ala	Val	Lys	Val	Thr	Pro
		180						185					190		
Gly	Ala	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser	Asn	Leu	Thr	His	Leu	Ser	Val	Lys	Tyr
		195					200					205			
Asn	Asn	Leu	Thr	Lys	Val	Pro	Arg	Gln	Leu	Pro	Pro	Ser	Leu	Glu	Tyr
		210				215					220				
Leu	Leu	Val	Ser	Tyr	Asn	Leu	Ile	Val	Lys	Leu	Gly	Pro	Glu	Asp	Leu
225					230					235				240	
Ala	Asn	Leu	Thr	Ser	Leu	Arg	Val	Leu	Asp	Val	Gly	Gly	Asn	Cys	Arg
				245					250					255	
Arg	Cys	Asp	His	Ala	Pro	Asn	Pro	Cys	Ile	Glu	Cys	Gly	Gln	Lys	Ser
		260						265					270		
Leu	His	Leu	His	Pro	Glu	Thr	Phe	His	His	Leu	Ser	His	Leu	Glu	Gly
		275					280					285			
Leu	Val	Leu	Lys	Asp	Ser	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Asn	Ser	Ser	Trp	Phe
		290				295					300				
Gln	Gly	Leu	Val	Asn	Leu	Ser	Val	Leu	Asp	Leu	Ser	Glu	Asn	Phe	Leu
305					310					315				320	
Tyr	Glu	Ser	Ile	Asn	His	Thr	Asn	Ala	Phe	Gln	Asn	Leu	Thr	Arg	Leu
				325					330					335	
Arg	Lys	Leu	Asn	Leu	Ser	Phe	Asn	Tyr	Arg	Lys	Lys	Val	Ser	Phe	Ala
		340						345					350		
Arg	Leu	His	Leu	Ala	Ser	Ser	Phe	Lys	Asn	Leu	Val	Ser	Leu	Gln	Glu
		355					360					365			
Leu	Asn	Met	Asn	Gly	Ile	Phe	Phe	Arg	Ser	Leu	Asn	Lys	Tyr	Thr	Leu
		370				375					380				
Arg	Trp	Leu	Ala	Asp	Leu	Pro	Lys	Leu	His	Thr	Leu	His	Leu	Gln	Met
385					390					395				400	
Asn	Phe	Ile	Asn	Gln	Ala	Gln	Leu	Ser	Ile	Phe	Gly	Thr	Phe	Arg	Ala
				405					410					415	
Leu	Arg	Phe	Val	Asp	Leu	Ser	Asp	Asn	Arg	Ile	Ser	Gly	Pro	Ser	Thr
		420						425				430			
Leu	Ser	Glu	Ala	Thr	Pro	Glu	Glu	Ala	Asp	Asp	Ala	Glu	Gln	Glu	Glu

[illegible]

20

